

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Einfluss des Glykoproteins WNT5A auf das Apoptoseverhalten
von Pankreaskarzinomzellen in vitro und In-vivo-Bildgebung
von NIS-positiven Pankreaskarzinom-Xenografts in
Nacktmäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Moritz Pralle
aus Gelnhausen
Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
29.01.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: PD Dr. P. Michl

1. Korreferentin: PD Dr. S. Müller-Brüsselbach

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Einleitung: erster Teil	6
1.1.1 Ein Überblick über Proteine der WNT-Familie	6
1.1.2 WNT-Signalwege	7
1.1.3 Die Apoptosesignalkaskade und ihre Regulation durch WNT-Proteine	12
1.1.4 WNT5A: Eigenschaften und Signalwege	14
1.1.5 WNT5A-Signalwege und ihr Einfluss auf Tumorzellen	15
1.1.6 Gegensätzliche Effekte von WNT5A in verschiedenen Tumoren	16
1.1.7 Das Pankreaskarzinom und WNT5A	18
1.1.8 Zielsetzungen der Doktorarbeit: erster Teil	20
1.2 Einleitung: zweiter Teil	21
1.2.1 Grundsätzliche Überlegungen zur Untersuchung der Progression des Pankreaskarzinoms „in vivo“ als Xenograft im Nacktmausmodell	21
1.2.2 In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Xenografts	22
1.2.3 Zielsetzung Doktorarbeit: zweiter Teil	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Laborgeräte	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Zellkultur (Nährmedien, Antibiotika, Zusätze, Behandlung)	26
2.1.5 Standards	26
2.1.6 Reagenziensets (Kits)	26
2.1.7 Enzyme	27
2.1.8 Vektoren und Expressionskonstrukte	27
2.1.9 Oligonukleotide	27
2.1.10. Antikörper	28
2.1.11 Protein	28
2.1.12. Biologisches Material	29
2.2 Proteinbiochemie	30
2.2.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zelllinien	30
2.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	31
2.2.3 SDS-Gelelektrophorese	32
2.2.4 Transfer von Protein auf eine Membran (Western Blotting)	33
2.2.5 Immunfärbung (Immunoblot)	34

2.3 Molekularbiologische Methoden/Genomics	34
2.3.1 DNA	34
2.3.2 RNA	41
2.4 Zellbiologische Methoden	42
2.4.1 Zellkultur	42
2.4.2 Transfektion von Zelllinien	43
2.4.3 Herstellung und Kultivierung stabiler Zelllinien	44
2.5 ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	46
2.5.1 Cell Death Detection ELISA ^{PLUS®} (Roche Diagnostics)	46
2.5.2 PathScan [®] Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling)	46
2.6 Tierexperimentelle Methoden	47
2.6.1 Versuchstiere	47
2.6.2 Subkutane Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäuse	47
2.6.3 In-Vivo-Bildgebung an NIS-positiven Zelllinien	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Ergebnisse: erster Teil	49
3.1.1 Effekte von WNT5A auf die TRAIL induzierte Apoptose in Gewebekulturzelllinien verschiedener Tumorentitäten	49
3.1.2 Effekte von WNT5A auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen	51
3.1.3 Effekt von WNT5A auf SAPK/JNK	56
3.2. Ergebnisse: zweiter Teil	58
3.2.1 Erstellung von NIS-positiven Zelllinien und In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Xenografts im Mausmodell	58
3.2.2 In-vivo-Bildgebung von Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts im Mausmodell	61
4. Diskussion	64
4.1 Diskussion: erster Teil	64
4.1.1 Die Effekte von WNT5A auf die TRAIL-induzierte Apoptose sind in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten nicht gegensätzlich	64
4.1.2 WNT5A wirkt in PaTu-8988t-Zellen antiapoptotisch und fördert die Chemotherapieresistenz	66
4.1.3 WNT5A hat keinen Einfluss auf die Regulation von SAPK/JNK in PaTu-8988t-Zellen	68
4.1.4 Fazit: erster Teil	70
4.2 Diskussion: zweiter Teil	70
4.2.1 In-vivo-Bildgebung von Pankreaskarzinom-Xenografts im Mausmodell	70

4.2.2 Fazit: zweiter Teil	71
5. Zusammenfassung	73
6. Abstract	75
Literaturverzeichnis	77
Abbildungen und Tabellen	92
Abbildungen	92
Tabellen	93
Abkürzungen	94
Lebenslauf	98
Verzeichnis akademischer Lehrer	99
Danksagung	100
Ehrenwörtliche Erklärung	102

1. Einleitung

1.1 Einleitung: erster Teil

1.1.1 Ein Überblick über Proteine der WNT-Familie

Die WNT-Protein-Familie umfasst eine große Gruppe von evolutionär hochkonservierten, sezernierten, cysteinreichen Glykoproteinen.

Das erste WNT-Gen, damals noch *Int1* benannt, wurde 1982 als Protoonkogen in viral induzierten Brusttumoren der Maus identifiziert (Nusse and Varmus, 1982). *Int1* ist identisch mit dem schon früher in *Drosophila* beschriebenen *Wingless*-Gen (*Wg*), welches dort in der Embryonalentwicklung die Segmentpolarität kontrolliert (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Rijsewijk et al., 1987). *Wg* und *Int* wurden zu WNT verschmolzen, um die neue Familie von Proteinen zu beschreiben (Nusse et al., 1991). Bislang wurden ausgehend von der Aminosäuresequenz 19 verschiedene WNT-Proteine in Menschen und Mäusen identifiziert (Wodarz and Nusse, 1998). Die einzelnen WNT-Proteine werden nochmals in Untergruppen zusammengefasst (z.B. WNT3 und WNT3A).

WNT-Proteine besitzen charakteristische gemeinsame Eigenschaften. Dazu gehören das Molekulargewicht von ca. 40 kDa, die Signalsequenz für die Sekretion, viele Glykosylierungsstellen, mehrere hochgeladene Aminosäurereste und ein nahezu gleichbleibendes Muster von 23 Cysteinresten (Miller, 2002). Diese suggerieren, dass bei der Proteinfaltung multiple Disulfidbrücken eine Rolle spielen könnten (Mason et al., 1992).

WNT-Proteine sind hydrophob und vor allem mit Lipidmembranen und der extrazellulären Matrix assoziiert (Reichsman et al., 1996). Ursächlich hierfür ist eine Lipidmodifikation (Willert et al., 2003).

Klassisch werden die WNT-Proteine ausgehend von ihrer Fähigkeit, die murine epitheliale Brustzelllinie C57MG zu transformieren oder auch nicht zu transformieren, in „stark-transformierende“ (WNT 1, 3, 3A, 7) und „intermediär/nicht-transformierende“ (WNT 2, 4, 5A, 5B, 6, 7B, 11) WNT-Proteine eingeteilt (Wong et al., 1994).

WNT-Proteine vermitteln ihre Effekte über die Bindung an Membranrezeptoren und nachfolgend über die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden.

Durch die Regulation von Zellfunktionen wie Polarität, Adhäsion, Differenzierung, Proliferation und Apoptose spielen sie eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung und in physiologischen Prozessen (Logan and Nusse, 2004). Entsprechend dieser zentralen Rolle hat die Dysregulation oder abnorm gesteigerte Aktivierung der WNT-Signalwege weitreichende Konsequenzen. Verschiedene Erkrankungen des Menschen vom Kolonkarzinom (Kinzler et al., 1991; Oving and

Clevers, 2002) und anderen soliden Tumoren (Reya and Clevers, 2005), über Knochendichtedefekte (Boyden et al., 2002) bis hin zur Tetra-Amelie (Niemann et al., 2004) beruhen auf Störungen der WNT-Signalwege.

1.1.2 WNT-Signalwege

Man unterscheidet gewöhnlich zwischen dem kanonischen WNT/ β -catenin-Signalweg und einer Vielzahl von nicht-kanonischen Signalwegen, von denen der PCP (planar cell polarity)-Signalweg und der Ca^{2+} -abhängige Signalweg die geläufigsten sind. Dabei werden die transformierenden WNT-Proteine eher mit dem kanonischen und die nicht-transformierenden eher mit den nicht-kanonischen Signalwegen in Verbindung gebracht. Welcher Signalweg jedoch im Einzelfall aktiviert wird, ist vor allem vom Rezeptorenbesatz des jeweiligen Zellsystems abhängig (van Amerongen et al., 2008).

1.1.2.1 Der WNT/ β -catenin-Signalweg

Der kanonische Signalweg ist mit Abstand am besten untersucht. Er spielt eine Schlüsselrolle in der Steuerung von Zellproliferation, -polarität und -determination während der embryonalen Entwicklung und der Gewebehomöostase des Erwachsenen (Logan and Nusse, 2004).

Die Aktivierung des WNT/ β -catenin-Signalwegs setzt die Interaktion des WNT-Protein-Liganden mit einem Rezeptorkomplex bestehend aus dem 7TM-Rezeptor Frizzled (Fz) und den LDL-receptor-related-proteins 5/6 (LRP5/6) voraus (Logan and Nusse, 2004). Wie bei anderen Signalwegen auch, löst die Bindung des WNT-Liganden eine Konformationsänderung im Fz-LRP5/6-Rezeptordimer aus, die zu einer Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen führt. Im Gegensatz zu anderen Signalwegen, die nach diesem Prinzip arbeiten, ist das Ziel jedoch nicht die Verstärkung eines Signals sondern das Ziel ist es, die in Abwesenheit einer WNT-Ligand-Bindung vorherrschende kontinuierliche Unterdrückung der intrazellulären Signalkaskade zu beenden.

Die zentrale Rolle dabei spielt die Degradierung des Transkriptionsfaktors β -catenin durch den sog. Zerstörungskomplex. Dieser besteht aus dem Gerüstprotein Axin, den Tumorsuppressorproteinen APC und WTX sowie den beiden Serin-Threonin-Kinasen GSK3 und CK1 (Clevers and Nusse, 2012).

In Abwesenheit eines WNT-Signals bindet der Zerstörungskomplex β -catenin, welches in der Folge zunächst sequentiell phosphoryliert, danach ubiquityniert und schließlich über das Proteasom abgebaut wird (Aberle et al., 1997; Kimelman and Xu, 2006).

Die Bindung von WNT-Protein an den Fz-LRP5/6-Rezeptorkomplex setzt nun eine Reihe von Ereignissen in Gang, die letztlich zu erhöhten β -catenin Konzentrationen in der Zelle führen.

Die Rezeption von WNT bewirkt eine Konformationsänderung im Fz-LRP5/6-Rezeptordimer, welche eine Phosphorylierung des zytoplasmatischen Schwanzes von LRP 5/6 nach sich zieht (Tamai et al., 2004). Im phosphorylierten Zustand dient der zytoplasmatische Schwanz von LRP 5/6 als Andockstelle für Axin (Mao et al., 2001). Währenddessen interagiert der zytoplasmatische Teil von Fz mit dem Protein Dishevelled (Dsh) (Wong et al., 2003). Dsh besitzt eine DIX-Domäne, die man auch in Axin findet. Über diese Domäne können Dsh und Axin direkt aneinander binden (Fiedler et al., 2011; Schwarz-Romond et al., 2007). Somit bilden die zytoplasmatischen Bestandteile des Fz-LRP5/6-Rezeptorkomplexes zusammen mit Axin und Dsh an der Plasmamembran ein Multimer (Clevers and Nusse, 2012). Aktuelle Daten zeigen, dass der Zerstörungskomplex innerhalb dieses Multimers nicht mehr in der Lage ist β -catenin zu ubiquitinylieren und damit phosphoryliertes gegen nicht-phosphoryliertes β -catenin auszutauschen. Der Komplex ist mit phosphoryliertem β -catenin gesättigt, während neu synthetisiertes β -catenin im Zytoplasma akkumuliert (Li et al., 2012).

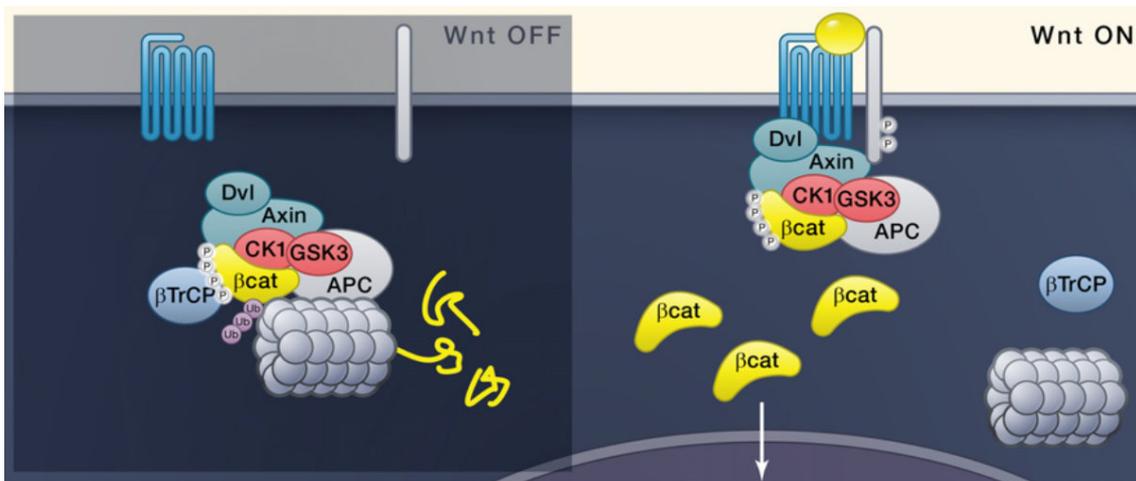


Abb. 1.1.1: Die kanonische Signalkaskade auf der Ebene des Zerstörungskomplexes. Die Bindung von WNT-Protein an den Rezeptorkomplex verhindert die Phosphorylierung und Degradierung von β -catenin. Modifiziert nach (Clevers and Nusse, 2012).

Bei steigenden β -catenin-Konzentrationen gelangt dieses vermehrt in den Zellkern und aktiviert DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996).

Die kanonische Signalkaskade beeinflusst eine große Anzahl von Zielgenen (Vlad et al., 2008). Welche dies im jeweiligen Fall genau sind, ist abhängig vom Gewebe und vom zellulären Kontext (Logan and Nusse, 2004). In malignen Geweben werden z.B. Onkogene wie c-myc und Matrix-Metalloproteasen β -catenin abhängig exprimiert (Brabletz et al., 1999; He et al., 1998). Darüber hinaus werden Mutationen von Bestandteilen der kanonischen Signalkaskade (z.B. von APC, Axin und β -catenin) in

einer ganzen Reihe von Tumorentitäten gefunden (Reya and Clevers, 2005), was die zentrale Rolle des kanonischen Signalwegs für die Entstehung und Progredienz von Tumoren unterstreicht.

1.1.2.2 Der WNT/PCP-Signalweg

Während der kanonische WNT/ β -catenin-Signalweg zu den am besten untersuchten Signalwegen überhaupt gehört, sind die nicht-kanonischen Signalwege weniger gut erforscht.

Die entscheidende Funktion des PCP-Signalwegs besteht in der Vermittlung von Zellpolarität und von Zellmigration (Komiya and Habas, 2008).

Wie bei der kanonischen Signalkaskade steht auch beim WNT/PCP-Signalweg in Vertebraten am Anfang die Interaktion von WNT-Proteinen mit Fz-Rezeptoren. Am Ende steht allerdings weniger eine Transkriptionsleistung sondern ein direktes Neuarrangement des Zytoskelettes (Komiya and Habas, 2008).

Auch das Spektrum an Proteinen der WNT-Familie, welche den PCP-Signalweg aktivieren können, unterscheidet sich von denen, die mit der kanonischen Signalkaskade assoziiert sind. Mit dem PCP-Signalweg werden vor allem Mitglieder der nicht/intermediär-transformierenden WNT-Proteine in Verbindung gebracht, so z.B. WNT5A (Kilian et al., 2003), WNT11 (Heisenberg et al., 2000) und WNT4 (Ciruna et al., 2006).

Die PCP-Signaltransduktion ist im Gegensatz zum β -catenin-Signalweg unabhängig von einer Interaktion von Fz mit LRP5/6 (He et al., 2004). Dafür wurde jedoch eine ganze Reihe von anderen möglichen Ko-Rezeptoren identifiziert: allen voran ROR2 (Nishita et al., 2006) aber auch NRH1, Ryk und PTK7 (Lu et al., 2004a; Lu et al., 2004b; Sasai et al., 2004).

Der WNT-Bindung durch den Fz-Rezeptorkomplex folgt intrazellulär die Rekrutierung von Dsh. Dieses besitzt neben DIX noch zwei weitere Domänen: PDZ und DEP, über welche die beiden kleinen GTPasen Rho und Rac aktiviert werden (Habas and Dawid, 2005). Gleichzeitig erfolgt so auch die Aufspaltung des PCP-Signalwegs in zwei parallele Pfade.

Zum einen aktiviert ein Komplex aus Dsh und Daam1 die kleine GTPase Rho und diese nachfolgend die Kinase ROCK, welche die regulatorische Leichtkette von Myosin phosphoryliert mit dem Ziel einer Umgestaltung bzw. Modifikation des zellulären Aktin-Zytoskelettes (Habas et al., 2001; Marlow et al., 2002; Winter et al., 2001).

Zum anderen interagiert die DEP-Domäne von Dsh unabhängig von Daam1 mit der GTPase Rac, welche in der Folge die Kinase SAPK/JNK stimuliert (Li et al., 1999). Darüber hinaus ist zumindest für WNT5A ein weiterer Fz/Dsh-unabhängiger

Mechanismus der SAPK/JNK-Aktivierung bekannt, welcher direkt von ROR2 vermittelt wird (Schambony and Wedlich, 2007).

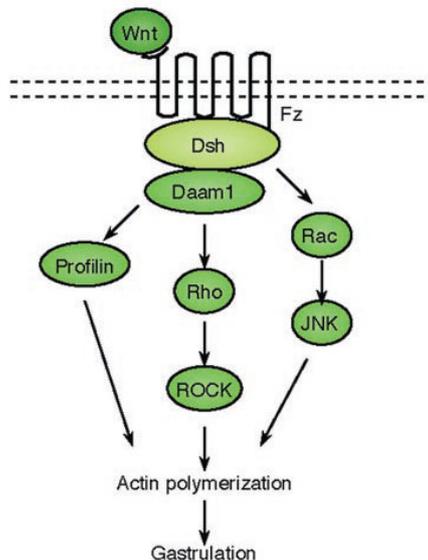


Abb. 1.1.2: Der WNT/PCP-Signalweg. Modifiziert nach (Komiya and Habas, 2008).

Die SAPK/JNK bilden eine Untergruppe der MAP (mitogen activated protein)-Kinasen. Sie sind im humanen Gewebe quasi ubiquitär vorhanden und an der Regulation einer Reihe kritischer Zellfunktionen, wie z.B. DNA-Reparatur, Apoptose und Zellproliferation, beteiligt (Karin and Gallagher, 2005). Sie phosphorylieren vor allem die aktivierende Domäne von c-jun, einer Untereinheit des AP-1 Transkriptionsfaktors (Dérillard et al., 1994). Dies induziert die Transkription von mindestens 250 verschiedenen Zielgenen (Hayakawa et al., 2004), von denen ein großer Teil mit DNA-Reparaturmechanismen assoziiert ist (Karin and Gallagher, 2005). Was nicht verwunderlich scheint, bedenkt man, dass die SAPK/JNK-abhängige Phosphorylierung von c-jun ursprünglich als Reaktion auf UV-Stress entdeckt wurde (Dérillard et al., 1994). Aber nicht nur UV-Stress sondern auch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interleukine, Wachstumsfaktoren oder Onkogene wie aktiviertes Ras führen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von c-jun durch SAPK/JNK (Kyriakis et al., 1995; Smeal et al., 1991).

Es ist bekannt, dass SAPK/JNK eine wichtige Rolle bei der Regulation des apikalen Aktinnetzwerkes epithelialer Zellen sowie bei der Aktin-Polymerisation spielt (Homsy et al., 2006; Llense and Martín-Blanco, 2008). Welche Effekte die Aktivierung von SAPK/JNK im Rahmen der PCP-Signalkaskade genau vermittelt, ist allerdings weiterhin unbekannt (Komiya and Habas, 2008).

1.1.2.3 Der Ca^{2+} -abhängige WNT-Signalweg

Der zentrale Baustein des dritten gut beschriebenen WNT-Signalwegs ist ein rascher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach der Bindung von WNT-Protein an Fz-Rezeptoren.

Wie der WNT/PCP-Signalweg wird auch die Ca^{2+} -abhängige Signalkaskade in der Literatur häufig mit den nicht-transformierenden Mitgliedern der WNT-Familie in Verbindung gebracht, und von diesen vor allem mit WNT5A (De, 2011).

Im Gegensatz zum kanonischen Signalweg folgt bei der Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade der WNT/Fz-Interaktion ein kurzzeitiger Konzentrationsanstieg der beiden Signalmoleküle IP3 und DAG. IP3 und DAG entstehen durch die Spaltung von membrangebundenem PIP2 durch die Phospholipase C (De, 2011). Die Zunahme der zyttoplasmatischen IP3-Konzentration bewirkt einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER ins Zytosol (De, 2011). In der Folge wird eine Vielzahl von zellulären Mechanismen Ca^{2+} -abhängig reguliert.

Zum einen aktivieren Ca^{2+} -Ionen zusammen mit Calmodulin die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (Kühl et al., 2000). Zum anderen aktiviert DAG in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen die Proteinkinase C (PKC) (Sheldahl et al., 1999). Beides führt zu einer gesteigerten Aktivität einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, darunter CREB und NF κ B (De, 2011). Über einen ähnlichen Mechanismus verstärkt die Phosphatase Calcineurin Ca^{2+} -abhängig die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT (Hogan et al., 2003).

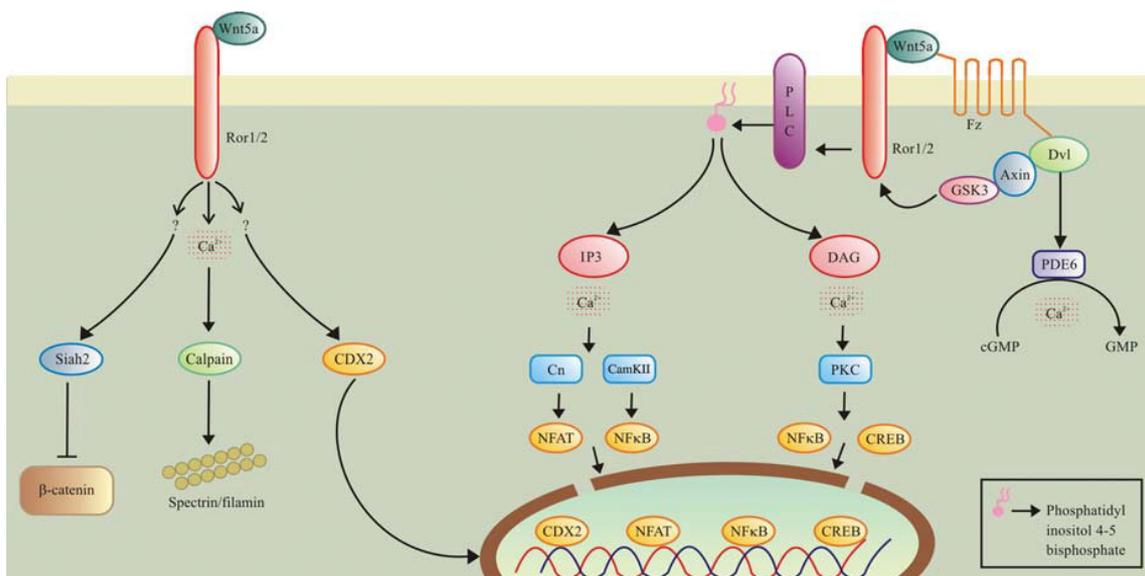


Abb. 1.1.3: Der WNT/ Ca^{2+} -Signalweg. Modifiziert nach (De, 2011).

Über eine reine Beeinflussung der Transkription hinaus sind noch eine Vielzahl von weiteren WNT/ Ca^{2+} -abhängigen Effekten beschrieben, so z.B. eine Aktivierung der

Phosphodiesterase 6 (Wang et al., 2004) und eine Modifikation des Zytoskeletts durch Interaktion der Protease Calpain mit den Proteinen Spectrin und Filamin (O'Connell et al., 2009; Yang et al., 2011).

Die drei beschriebenen Signalkaskaden stehen exemplarisch für eine Vielzahl von WNT-Transduktionsmechanismen, die auf komplexe Weise interagieren. Demzufolge wäre es zutreffender, von einem Netzwerk statt von einzelnen Signalwegen zu sprechen. Dabei sind verschiedene Anteile des Netzwerks in verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich akzentuiert, was die Vorhersage einer spezifischen WNT-Wirkung im Einzelfall nahezu unmöglich macht. Somit muss letztlich für jedes Zellsystem eine individuelle Bewertung erfolgen.

1.1.3 Die Apoptosesignalkaskade und ihre Regulation durch WNT-Proteine

Es gibt zwei unterschiedliche Formen des Zelltodes bei Eukaryonten: Nekrose und Apoptose. Während die Nekrose einen pathologischen Prozess beschreibt, ist die Apoptose ein physiologischer Ablauf, über den ungewollte Zellen aus einem multizellulären Organismus entfernt werden, ohne einen Gewebeschaden zu hinterlassen (Hengartner, 2000; Kerr et al., 1972). Zu solchen ungewollten Zellen zählen z.B. bestimmte Lymphozyten, infizierte Zellen aber auch Tumorzellen. Man unterscheidet zwei verschiedene Arten der Apoptoseinduktion: den intrinsischen Weg, welcher z.B. bei irreparablen DNA-Schäden im Rahmen einer Chemotherapie von der Zelle selbst eingeleitet wird, und den extrinsischen Weg, welcher durch ein Signal von außen, sprich die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor der TNF-Familie, ausgelöst wird (Pennarun et al., 2010). Beide Wege sind untereinander vernetzt und in der Endstrecke werden die gleichen Effektoren aktiviert. Letztlich führt die Aktivierung der Apoptosekaskade zu einer Zellschrumpfung, zum Abbau von Zytoskelett und Kernmembran und zur Fragmentierung der DNA. Die Zellmembran bleibt anders als bei der Nekrose intakt. Die vesikulären Zellreste werden von Phagozyten aufgenommen (Kerr et al., 1972).

Obwohl in Tumoren in der Regel eine höhere Apoptoserate herrscht als in normalen Geweben (Koornstra et al., 2003), spielt die Fähigkeit sich einer extrinsischen Apoptoseinduktion zu entziehen eine wesentliche Rolle in der Tumorprogression und der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz (Zhang and Fang, 2005).

Im Folgenden soll der extrinsische Apoptoseweg beispielhaft anhand der TRAIL-Signalkaskade beschrieben werden.

TRAIL gehört zur TNF-Superfamilie und ist bekannt für seinen starken apoptotischen Einfluss auf Tumorzellen bei minimaler Toxizität für nicht-transformierte Zellen (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). In Folge der Bindung von TRAIL an seinen Rezeptor werden FADD und die Pro-Caspase 8 zur Zellmembran rekrutiert und bilden den DISC

(death-inducing signaling complex) (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 1995). Die Enzymfamilie der Caspasen stellt einen wesentlichen Baustein der Apoptosekaskade dar (Cohen, 1997). Man unterscheidet die inaktiven Pro-Caspasen und die aktiven Caspasen sowie Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen (Hengartner, 2000). Durch proteolytische Spaltung im DISC wird die Pro-Caspase 8 aktiviert. Sie aktiviert nun entweder direkt die Effektor-Caspase 3 und nachfolgend die Caspasen 6 und 7, was unmittelbar eine Fragmentation der DNA und den Zelltod nach sich zieht, oder sie führt zur Aktivierung des Proteins Bid und schafft damit eine Verbindung zum intrinsischen Weg (Scaffidi et al., 1998). Bid und andere Mitglieder der bcl-2 Familie bewirken eine Freisetzung von Cytochrom C, Smac und DIABLO aus dem Mitochondrium (Goonasinghe et al., 2005; van Loo et al., 2002). Im Zytosol bildet Cytochrom C zusammen mit Apaf-1 das sog. Apoptosom, welches die Pro-Caspase 9 rekrutiert und aktiviert (Li et al., 1997). Die Caspase 9 aktiviert nun die Pro-Caspase 3 und leitet damit die Endstrecke der Apoptosekaskade ein.

Wie bereits beschrieben sind die WNT-Signalwege an einer Vielzahl physiologischer sowie pathologischer Prozesse wie z.B. der Tumorentstehung und -progression beteiligt. Ein fundamentales Merkmal maligner Zellen besteht darin, sich externer Apoptosesignale zu entziehen. Bedenkt man diese beiden Punkte, so stellt sich die Frage, ob es eine Beziehung zwischen der Dysregulation von WNT-Signalwegen und der Entwicklung einer Apoptoseresistenz von Tumorzellen gibt.

Für die kanonische Signalkaskade ist ein Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Zellen gut belegt. Durch Mikroarray-Analysen in β -catenin-überexprimierenden HeLaT-Zellen konnte eine ganze Reihe von Zielgenen des kanonischen Signalwegs, welche gleichzeitig eine Funktion in der Apoptosekaskade haben, identifiziert werden (Huang et al., 2006). In Rat-1-Zellen führt die Aktivierung der kanonischen Signalkaskade durch WNT1 zu einer Hemmung der Chemotherapie-induzierten Apoptose (Chen et al., 2001). Dieser Effekt konnte durch eine Inhibition von TCF rückgängig gemacht werden. Auch Mutationen von APC, wie sie beispielsweise im Kolonkarzinom vorkommen, können zu einer verminderten Expression von Caspasen und einer Resistenz gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose führen (Chen et al., 2003).

Ob die nicht-kanonischen Signalwege einen Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen haben ist nicht abschließend geklärt. Allerdings gibt es Berichte, dass eine Aktivierung von SAPK/JNK Tumoren für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert. In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231-KS konnte gezeigt werden, dass der synergistische Effekt von TRAIL und Doxorubicin/Cisplatin auf die Apoptose durch eine Aktivierung von SAPK/JNK vermittelt wird (Ohtsuka et al., 2003). Ein ähnlicher Effekt von SAPK/JNK wurde bei Experimenten zur TRAIL-induzierten Apoptose in Prostatakarzinomzellen nachgewiesen (Sah et al., 2003).

1.1.4 WNT5A: Eigenschaften und Signalwege

WNT5A ist eines der am besten untersuchten Mitglieder der WNT-Proteinfamilie. Es wurde zeitgleich mit WNT5B isoliert, mit dem es 87% der Aminosäuresequenz teilt, (Nusse and Varmus, 1992) und hat weitreichende Funktionen während der embryonalen Entwicklung und in physiologischen Prozessen. So sind etwa WNT5A^{-/-}-Mäuse nicht überlebensfähig und sterben bei Geburt (Oishi et al., 2003). Im Gegensatz zu WNT1 kann WNT5A die murine Brustepithelzelllinie C57MG nicht transformieren (Wong et al., 1994) und gehört somit zu den nicht-transformierenden Mitgliedern der WNT-Familie.

Für WNT5A ist eine Interaktion mit zahlreichen Membranrezeptoren gesichert. Aus der großen Fz-Familie ist eine WNT5A-Signaltransduktion für Fz2, Fz3, Fz4, Fz5, Fz7 und Fz8 nachgewiesen (Nishita et al., 2010; Sato et al., 2010; Takada et al., 2005). Ebenfalls eine große Bedeutung scheint die Rezeptortyrosinkinase ROR2 zu haben (Oishi et al., 2003). ROR2 funktioniert als Rezeptor oder Ko-Rezeptor (Green et al., 2008) und ist in der Lage mit WNT5A und verschiedenen Fz-Rezeptoren ternäre Komplexe zu bilden (Nishita et al., 2010). Daneben wird WNT5A mit einer ganzen Reihe von weiteren Rezeptoren in Verbindung gebracht, wie etwa ROR1, RYK und PTK7 (Kikuchi et al., 2012).

Als nicht-transformierender WNT-Ligand ist WNT5A vor allem mit den nicht-kanonischen WNT-Signalwegen assoziiert.

So ist WNT5A im Rahmen des PCP-Signalwegs an der Ausbildung der planaren Zellpolarität in Mäusen beteiligt (Qian et al., 2007). Zudem ist die Aktivierung von Effektoren der WNT/PCP-Signalkaskade wie AP-1, Rac und SAPK/JNK als Folge eines WNT5A-Signals beschrieben (Nishita et al., 2010; Sato et al., 2010).

Die Fähigkeit von WNT5A über den Ca²⁺-abhängigen Signalweg zu agieren, ist ebenfalls gesichert. In Säugetierzellen kann WNT5A einen Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER hervorrufen, wodurch die PKC, die CaMKII und Calpain aktiviert werden (Ishitani et al., 2003; O'Connell et al., 2009; Weeraratna et al., 2002).

Während der Einfluss von WNT5A auf die nicht-kanonischen Signalkaskaden klar umschrieben ist, ist die Wirkung auf die kanonische Signalkaskade komplex und wird immer noch kontrovers diskutiert.

Eine der frühesten Beobachtungen im Zusammenhang mit WNT5A überhaupt war, dass es in der Lage ist, den β -catenin Signalweg zu inhibieren (Torres et al., 1996). Um diesen Antagonismus zu erklären, wurden im Wesentlichen drei Mechanismen vorgeschlagen, von denen die ersten beiden eine Aktivierung nicht-kanonischer Signalwege voraussetzen.

Zum einen kann WNT5A die β -catenin-abhängige Genexpression auf Transkriptionsebene hemmen. Dabei spielen vor allem die Aktivierung der NLK (Nemo-

like kinase) durch CaMK sowie von ROR α durch die PKC α eine Rolle (Ishitani et al., 2003; Lee et al., 2010).

Der zweite Ansatz bezieht sich auf die gesteigerte Expression von Siah2 als Antwort auf eine Stimulation mit WNT5A (Topol et al., 2003). Siah ist eine E3-Ubiquitin-Ligase und demzufolge an der Degradation von β -catenin beteiligt (Liu et al., 2001).

Das dritte Modell beschreibt eine Hemmung der Signaltransduktion kanonischer WNT-Liganden durch WNT5A auf Rezeptorebene im Sinne eines kompetitiven Antagonismus (Sato et al., 2010). Hierbei wird vorausgesetzt, dass das Potential von WNT5A die kanonische Signalkaskade zu aktivieren weitaus geringer ist als das der kanonischen Liganden.

Im Gegensatz zu den antagonistischen Effekten von WNT5A auf die kanonische Signalkaskade stehen Beobachtungen, nach denen WNT5A die Expression von β -catenin-Zielgenen aktiviert, so z.B. bei gleichzeitiger Überexpression von Fz4/7 und WNT5A in *Xenopus* Embryos (Umbhauer et al., 2000). Ebenso vermag WNT5A, bei Koinjektion mit Fz5, eine eigentlich WNT1/WNT3A abhängige Achsenduplikation zu vermitteln (He et al., 1997). Darüber hinaus kann WNT5A bei Überexpression von Fz4 und LRP5 den Transkriptionsfaktor TCF und damit die Expression von β -catenin Zielgenen aktivieren (Mikels and Nusse, 2006).

Wie dargestellt, wurden die positiven Effekte von WNT5A auf den kanonischen Signalweg zumeist in Zellsystemen beobachtet, in denen die Zahl bestimmter Rezeptoren der Fz-Familie hochreguliert war. Dies lässt den Schluss zu, dass der Effekt eines WNT5A Signals wesentlich vom jeweiligen Rezeptorkontext abhängt. Unter physiologischen Bedingungen mag WNT5A die nicht-kanonischen Signalkaskaden bevorzugen bzw. den β -catenin-Signalweg antagonisieren. Unter pathologischen Bedingungen, wie etwa in Tumorzellenverbänden, könnte sich dieses Bild jedoch vollkommen verändern. Im Zweifel muss deshalb der Einfluss von WNT5A abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext völlig neu bewertet werden.

1.1.5 WNT5A-Signalwege und ihr Einfluss auf Tumorzellen

Im Vergleich mit den transformierenden Mitgliedern der WNT-Familie spielt WNT5A bei der Initiation von Tumoren eine eher untergeordnete Rolle. Dafür ist der Einfluss von WNT5A auf die Progression, sprich auf das Fortschreiten von Tumoren durch Invasion und Metastasierung in fremde Gewebe, umso größer.

Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sind komplexe Prozesse. Beide sind abhängig von einem Zusammenspiel von Zelladhäsion und Zellmigration. WNT5A ist an beiden Prozessen entscheidend beteiligt.

So führt z.B. ein knock-down von WNT5A in HeLaS3-Zellen zu einer gestörten Adhäsion (Matsumoto et al., 2010) und über ein WNT/ROR2-Signal können

embryonale Fibroblasten zur Zellmigration angeregt werden (Nishita et al., 2006). In diesem Zusammenhang spielt auch der PCP-Signalweg eine Rolle, von dem bekannt ist, dass er Zellbewegungen durch zytoskelettale Reorganisation reguliert (Wallingford et al., 2002), und dessen Aktivierung möglicherweise das Verhalten von Tumoren beeinflusst (Jones and Chen, 2007).

Während Adhäsion und Migration physiologische Zellprozesse darstellen, ist eine Invasion von Zellen in fremde Gewebe spezifisch für Tumorzellen und maßgeblich für die Tumorprogression. Auch hieran ist WNT5A beteiligt. WNT5A vermittelt über ROR2 und SAPK/JNK gerichtete Migration und invasives Verhalten in murinen Fibroblasten (Nomachi et al., 2008). Ebenso wurde gezeigt, dass die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von CaMK und PKC durch WNT5A in Melanomzellen essentiell für das invasive Verhalten ist (Dissanayake et al., 2007; Weeraratna et al., 2002).

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind eine Gruppe von extrazellulär in der EZM lokalisierten Peptidasen. Ihre Expression durch Tumorzellen ist eng mit deren Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung verbunden (Chang and Werb, 2001). WNT5A wird mit der Expression von MMPs in verschiedenen Tumorentitäten in Verbindung gebracht. So induziert WNT5A durch die Aktivierung von SAPK/JNK die Expression von MMP-1 in Prostatakarzinomzellen (Yamamoto et al., 2010). In Osteosarkom- und Nierenzellkarzinomzellen wird die Expression von MMPs durch ein WNT5A/ROR2-Signal gesteuert (Enomoto et al., 2009; Wright et al., 2009).

Über diese Mechanismen, die vor allem die nicht-kanonischen Signalwege einbeziehen, leistet WNT5A einen starken Beitrag zur Progression von Tumoren.

Wie bereits beschrieben, kann WNT5A auf verschiedene Arten die kanonische Signalkaskade hemmen. Hierüber könnte WNT5A einen tumorsuppressiven Effekt besonders auf solche Tumorentitäten haben, deren Überleben von einer abnorm gesteigerten Aktivität der β -catenin Signalkaskade abhängig ist.

Unter bestimmten Umständen kann WNT5A die kanonische Signalkaskade jedoch auch aktivieren. In diesen Fällen könnte WNT5A durchaus das Tumorwachstum auf dem Weg der kanonischen Signalkaskade fördern.

Diese Vielzahl von teilweise gegensätzlichen Effekten macht es unmöglich ein einheitliches Bild der WNT5A Wirkung auf Tumoren zu zeichnen.

1.1.6 Gegensätzliche Effekte von WNT5A in verschiedenen Tumoren

Bedenkt man die enorme Variabilität der WNT5A-Signalwege, ist es wenig überraschend, dass WNT5A in unterschiedlichen Tumorgeweben auch unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Effekte hat.

Eine ganze Reihe von Untersuchungen zeigte, dass die Expression von WNT5A in verschiedenen Tumorgeweben supprimiert ist, so z.B. im kolorektalen Karzinom

(Dejmek et al., 2005a), im hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2008), im Mammakarziom (Dejmek et al., 2005b), im Neuroblastom (Blanc et al., 2005) und in akuten Leukämien (Liang et al., 2003). Im kolorektalen Karzinom (Dejmek et al., 2005a), im Schilddrüsenkarzinom (Kremenevskaja et al., 2005), im hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2008) sowie im Mammakarzinom (Jönsson et al., 2002) war eine reduzierte Expression von WNT5A assoziiert mit einem schlechteren histologischen Differenzierungsgrad des Tumors. Darüber hinaus konnte eine reduzierte WNT5A-Expression im Mammakarzinom (Dejmek et al., 2005b; Jönsson et al., 2002) und in der akuten lymphatischen Leukämie (Roman-Gomez et al., 2007) als Risikofaktor für eine schlechte Prognose identifiziert werden. Entsprechend ist die Expression von WNT5A im Dukes B Kolonkarzinom ein Prädiktor für eine gute Prognose (Dejmek et al., 2005a). Eine Reduktion der Expression in Tumoren sowie damit assoziiert ein schlechterer Differenzierungsgrad und eine schlechtere Prognose sind elementare Kennzeichen eines Tumorsuppressors. Unterstützt wird die Tumorsuppressor-Theorie durch die Beobachtung, dass die Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie SW-480 sowie der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 mit rekombinanten WNT5A-Protein bzw. mit einem synthetischen Peptid, das die WNT5A-Funktion imitiert, zu einer Abnahme der Zellmigration und verstärkter Zelladhäsion führt (Dejmek et al., 2005a; Säfholm et al., 2006).

Entgegen all diesen Beobachtungen kann WNT5A die maligne Progression von Tumoren jedoch auch fördern.

Es gibt eine ganze Reihe von Tumorentitäten, bei denen die weiter oben geschilderte Suppression der WNT5A-Expression nicht vorliegt. Im Gegenteil: WNT5A wird in Melanomzellen (Da Forno et al., 2008), Magenkarzinomzellen (Kurayoshi et al., 2006), im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Huang et al., 2005) und in Prostatakarzinomzellen (Wang et al., 2007) verstärkt exprimiert. Im Melanom und im Magenkarzinom ging die verstärkte Expression von WNT5A mit einem ungünstigeren Differenzierungsgrad einher (Da Forno et al., 2008; Kurayoshi et al., 2006). Sowohl beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom als auch beim Melanom ist eine verstärkte WNT5A-Expression ein unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Metastasierungsrate und für ein reduziertes Gesamtüberleben (Da Forno et al., 2008; Huang et al., 2005). Erstaunlicherweise hat man in transfizierten Melanomzellen, die konstitutiv WNT5A-überexprimieren, ebenfalls eine verstärkte Zelladhäsion gefunden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Experimenten mit SW-480 und MDA-MB-468 resultierte daraus allerdings eine deutlich verstärkte Zellinvasion (Weeraratna et al., 2002).

1.1.7 Das Pankreaskarzinom und WNT5A

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Histologisch finden sich in der überwiegenden Mehrzahl (ca. 85%) duktale Adenokarzinome des exokrinen Pankreas.

Weltweit ist es bei Männern die achthäufigste, bei Frauen die neunthäufigste krebisbedingte Todesursache (Jemal et al., 2011). In den westlichen Industrienationen ist die Inzidenz höher als in Entwicklungsländern. In den Vereinigten Staaten beträgt sie 8,8 auf 100.000 in der Gesamtbevölkerung, was einer jährlichen Neuerkrankungsrate von ca. 44.000 entspricht (Siegel et al., 2012). Dabei sind Männer um den Faktor 1,3 häufiger betroffen als Frauen (Ries, 2000). Die Inzidenzrate blieb in den letzten 35 Jahren zumindest in den USA stabil (Shaib et al., 2006).

Die Prognose ist infaust. Nahezu alle Patienten mit der Diagnose Pankreaskarzinom versterben auch an der Erkrankung (Siegel et al., 2012). Der einzige potentiell kurative Therapieansatz ist die Duodenopankreatektomie. Allerdings sind wegen fehlender Früherkennungsmaßnahmen lediglich 15 bis 20 Prozent der Pankreaskarzinome resektabel. Und auch bei vollständiger Resektion und ohne Lymphknotenbefall steigt die 5-Jahres-Überlebensrate nicht über 30 Prozent (Fernandez-del Castillo and Jimenez, 2012).

Zur Therapie des fortgeschrittenen duktales Adenokarzinoms stehen für die Mehrzahl der Patienten Therapieschemata auf der Basis des Nukleosidanalogs Gemcitabine als palliativer Ansatz zur Verfügung (Carmichael et al., 1996; Casper et al., 1994).

Als Cytidin-Analoga stören Gemcitabine bzw. seine aktiven Metaboliten Gemcitabine-Di- und Triphosphat auf verschiedenen Wegen die zelluläre DNA-Synthese (Mini et al., 2006). Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Einbau von Gemcitabine-Triphosphat in die DNA, denn dieser führt zum Abbruch der DNA-Polymerisation und zu Einzelstrangbrüchen und damit letztlich auch zur Apoptose (Huang et al., 1991; Ross and Cuddy, 1994).

Obwohl mit Gemcitabine die mediane Überlebensdauer um einen Monat im Vergleich zu einer Therapie mit 5-FU erhöht werden konnte, liegt die 1-Jahres-Überlebensrate weiterhin bei ernüchternden 18 Prozent (Burriss et al., 1997). Seit kurzem kann Gemcitabine mit Erlotinib, einem „small-molecule“ Inhibitor des EGFR (epidermal growth factor receptor), kombiniert werden, was allerdings nur zu einer minimalen Verlängerung der Überlebenszeit führt (Moore et al., 2007).

Heutzutage geht man von einer schrittweisen Tumorgenese des duktales Adenokarzinoms über Vorläuferläsionen, den sog. PanIN (**pan**creatic **intraepithelial neoplasia**)-Läsionen, aus (Hruban et al., 2001). Dabei stehen die PanIN-Läsionen I bis III für zunehmend schwerere Dysplasiegrade. Analog der für das kolorektale Karzinom postulierten Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al., 1988) kommt es auch beim

duktalen Adenokarzinom des Pankreas zu einer Ansammlung aktivierender und inaktivierender Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressoren, die ein Fortschreiten bis zum Karzinom bedingen. Hervorzuheben sind hierbei die aktivierende Mutation des Onkogens K-ras (Hruban et al., 1993), die Inaktivierung der Tumorsuppressoren TP53 (Redston et al., 1994), p16/CDKN2A (Schutte et al., 1997) und SMAD4 (Jones et al., 2008) sowie der DNA-Reparaturgene hMLH1 und MSH2 (Wilentz et al., 2000).

Der TGF- β (transforming growth factor β)-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese. Während TGF- β für seine Fähigkeit bekannt ist, die epitheliale Zellproliferation zu hemmen und die Apoptose zu fördern, wirkt es in fortgeschrittenen Tumorstadien tumorprogressiv (Roberts and Wakefield, 2003). So auch im Pankreaskarzinom, wo es eine gesteigerte Tumorzellmigration und -invasion vermittelt (Ellenrieder et al., 2001). Ein Zielgen von TGF- β ist CUTL1 (Michl et al., 2005). CUTL1 (auch bekannt als CUX1) gehört zur Familie der „homeodomain“-Transkriptionsfaktoren und ist an der Regulation von Zelldifferenzierung, Zellwachstum und der embryonalen Entwicklung beteiligt (Nepveu, 2001). CUTL1 ist mit erhöhter Migration und Invasivität verschiedener Tumore assoziiert, in vitro und in vivo (Michl and Downward, 2006; Michl et al., 2005). In Pankreaskarzinomschnitten konnte CUTL1 immunhistochemisch nachgewiesen werden und zwar verstärkt in Geweben mit einem schlechteren Differenzierungsgrad, was eine Bedeutung von CUTL1 bei der Progression des Pankreaskarzinoms nahelegt (Michl et al., 2005). Zudem konnten über Mikroarray-Expressionsprofile Zielgene von CUTL1 identifiziert werden und eines von ihnen war WNT5A (Michl et al., 2005).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bereits weitreichende Untersuchungen zur Rolle von WNT5A im Pankreaskarzinom angestellt.

Mittels Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass WNT5A im duktalem Adenokarzinom des Pankreas deutlich stärker exprimiert wird als in normalem Pankreasgewebe. Dabei nimmt die Expression von WNT5A auch in den PanIN-Läsionen von Grad I bis Grad III, d.h. mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes, kontinuierlich zu. Dieser Befund lässt eine Bedeutung von WNT5A in der Karzinogenese und Progression des Pankreaskarzinoms vermuten (Ripka, 2007; Ripka et al., 2007).

Ein „knock-down“ von WNT5A mittels RNA-Interferenz führte zu verminderter Migration und Invasion von verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien (PANC1, HT1080, Imim-Pc1 und MiaPaca). Entsprechend konnte durch Behandlung mit rekombinantem WNT5A sowie durch eine stabile induzierbare Überexpression in Panc1-Zellen eine Steigerung des Migrations- bzw. Invasionsverhaltens erzielt werden (Ripka, 2007; Ripka et al., 2007).

Darüber hinaus zieht die Repression von WNT5A mittels RNA-Interferenz eine deutlich gesteigerte Apoptoserate der Pankreaskarzinomzelllinien PaTu-8988t, Panc-1, Imim-Pc1 und MiaPaca nach sich. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit TRAIL noch einmal gesteigert werden (Ripka, 2007).

WNT5A steigert also die Migration und Invasion von Pankreaskarzinomzellen und wirkt antiapoptotisch. Bedenkt man die Komplexität des WNT5A-Signalnetzwerks und seine Variabilität in verschiedenen Geweben, so ist es notwendig zu ermitteln, über welche der verschiedenen Signalkaskaden WNT5A seine Effekte im Pankreaskarzinom vermittelt.

Überraschenderweise konnte WNT5A, das als typisches nicht-kanonisches WNT-Protein gilt, die PKC nicht aktivieren und auch seine Effekte auf die CaMK II waren nicht statistisch signifikant. Im Gegenzug konnte eine Aktivierung der kanonischen Signalkaskade durch WNT5A nachgewiesen werden. Und zwar sowohl in Form einer gesteigerten TCF/LEF-Aktivität nach Stimulierung mit rekombinantem WNT5A (bzw. verminderter Aktivität nach Behandlung mit siWNT5A) als auch in Form einer verminderten nukleären Translokation von β -catenin nach Repression von WNT5A durch RNA-Interferenz (Ripka, 2007; Ripka et al., 2007).

Somit scheint WNT5A zumindest einen Teil seiner Effekte im Pankreaskarzinom über den kanonischen Signalweg zu entfalten.

1.1.8 Zielsetzungen der Doktorarbeit: erster Teil

a) Hat WNT5A unterschiedliche Effekte auf die TRAIL-induzierte Apoptose in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten?

Während ein antiapoptotischer Effekt von WNT5A auf Pankreaskarzinomzelllinien klar belegt ist, wurde ein Einfluss insbesondere auf das Apoptoseverhalten von Tumorzelllinien, in denen WNT5A im Gegensatz zum Pankreaskarzinom als Tumorsuppressor wirken soll, bislang nicht untersucht. In dieser Arbeit soll daher die Apoptoserate verschiedener Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem TRAIL-Liganden und siWNT5A verglichen werden. Dabei wurde zum einen die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu-8988t, für die ein antiapoptotischer Effekt von WNT5A bereits nachgewiesen werden konnte, ausgewählt (Ripka, 2007) und zum anderen die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 sowie die Kolonkarzinomzelllinie SW-480, in denen WNT5A tumorsuppressiv wirken soll (Dejmek et al., 2005a; Säfholm et al., 2006). Auf diese Weise soll überprüft werden, ob WNT5A auch in Bezug auf das Apoptoseverhalten gegensätzliche Effekte in verschiedenen Tumorentitäten hat.

b) Können die antiapoptotischen Effekte von WNT5A auf PaTu-8988t-Zellen in Experimenten mit rekombinantem WNT5A bzw. stabiler WNT5A-Überexpression bestätigt werden?

Die bisherigen Experimente unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss von WNT5A auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen beschränkten sich auf die Repression von WNT5A mittels RNA-Interferenz. Diese Arbeit soll die antiapoptotische Wirkung von WNT5A in Experimenten mit stabil WNT5A-überexprimierenden PaTu-8988t-Zellen bzw. in Experimenten mit rekombinatem WNT5A bestätigen. Dabei soll nicht nur die TRAIL-induzierte Apoptose untersucht werden, sondern auch der Einfluss von WNT5A auf die Apoptoseinduktion mit Gemcitabine, dem Erstlinientherapeutikum des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms.

c) Aktiviert WNT5A SAPK/JNK und damit den PCP-Signalweg?

In Vorarbeiten konnte ein Effekt von WNT5A auf die kanonische Signalkaskade im Pankreaskarzinom nachgewiesen werden, während der Ca^{2+} -abhängige Signalweg nicht beeinflusst wurde. Da WNT5A als typisches nicht-kanonisches WNT-Protein gilt und da die Effekte auf die kanonische Signalkaskade zwar konstant aber moderat ausgefallen waren, scheint die Aktivierung eines weiteren Signalwegs durch WNT5A im Pankreaskarzinom wahrscheinlich. Besonders eine Aktivierung von SAPK/JNK durch WNT5A wurde in Pankreaskarzinomzellen bisher nicht ausgeschlossen, obwohl ein Effekt von WNT5A auf SAPK/JNK in anderen Zellsystemen bereits beschrieben wurde. Zudem scheint die Aktivierung von SAPK/JNK die Chemotherapie/TRAIL-induzierte Apoptose zu beeinflussen. Eine Interaktion von SAPK/JNK und WNT5A im Pankreaskarzinom könnte somit ein Alternativmodell für die bisher beobachteten Effekte liefern.

1.2 Einleitung: zweiter Teil

1.2.1 Grundsätzliche Überlegungen zur Untersuchung der Progression des Pankreaskarzinoms „in vivo“ als Xenograft im Nacktmausmodell

In der jüngsten Vergangenheit wurde mit Hilfe von Hochdurchsatzverfahren eine ganze Reihe von Genen identifiziert, welche im Vergleich zum Normalgewebe im Pankreaskarzinom unterschiedlich reguliert sind (Gress et al., 1996). Mit der RNA-Interferenz Technik oder durch die Überexpression mit Tet-induzierbaren Systemen kann die tumorbiologische Relevanz solcher Kandidatengene in vitro charakterisiert werden. Auf diesem Weg wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit WNT5A und CUTL bereits zwei potente Vermittler von Progression, Invasion und Apoptoseresistenz im Pankreaskarzinom beschrieben (Michl et al., 2005; Ripka, 2007; Ripka et al., 2007). Um ihre Eignung für neue diagnostische oder therapeutische Strategien zu evaluieren reichen allerdings reine in vitro Analysen nicht aus. Insbesondere, da sich beim Pankreaskarzinom wegen fehlender Früherkennungsmöglichkeiten die Untersuchung von frühen Tumorstadien und Vorläuferläsionen äußerst schwierig gestaltet, kommt

hier den tierexperimentellen Tumorprogressionsmodellen eine besondere Bedeutung zu.

Am häufigsten werden dabei menschliche Tumorzellen als Xenograft in athymische Nacktmäuse implantiert. Wurden die Tumorzellen vorher stabil mit einem Tet-induzierbaren/-reprimierbarem System transfiziert, so kann durch die Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser der Mäuse der Einfluss eines bestimmten Kandidatengens auf die Tumorprogression in vivo untersucht werden.

Ein grundlegendes Problem dieses Ansatzes besteht in der kontinuierlichen Erfassung der Größenzunahme der Xenografts über die Dauer des Experiments, um den Effekt eines bestimmten Gens oder einer Therapie auf das Tumorwachstum zu dokumentieren. Dies ist bisher nur bei subkutaner Injektion der Tumorzellen einfach möglich. Unter klinischen Gesichtspunkten weitaus interessanter ist allerdings die Untersuchung von Tumorausbreitung und Metastasierung nach orthotoper Implantation der Tumorzellen direkt in die Pankreasloge oder nach Injektion in die Schwanzvene im Sinne eines pulmonalen Kolonisierungsmodells. Eine Dokumentation der Progression im Zeitverlauf ist hierbei mit konventionellen Techniken nicht möglich.

Deshalb gilt es, neue Verfahren der In-vivo-Bildgebung zu entwickeln, mit denen orthotope Xenografts bzw. Metastasen im Zeitverlauf visualisiert werden können, und zwar ohne Tötung der Tiere. Hierdurch könnte somit nicht nur die Aussagekraft des Experiments gesteigert werden, sondern auch die Zahl der benötigten Versuchstiere reduziert werden.

1.2.2 In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Xenografts

Der Natrium-Jodid-Symporter (NIS) ist ein an der basolateralen Zellmembran lokalisiertes Transportprotein, über welches Jodid im Austausch mit Natrium in die Zelle aufgenommen werden kann. Das NIS-Protein kommt in verschiedenen Geweben des Körpers vor, darunter in Magen und Speicheldrüsen, aber vor allem in der Schilddrüse (Schipper et al., 2007). Die Schilddrüse benötigt Jod zur Produktion der beiden Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4), weshalb hier das NIS-Protein besonders stark exprimiert wird.

Diesen Umstand macht man sich bereits seit Jahrzehnten bei der Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen zu Nutze. So kann Schilddrüsengewebe gezielt durch die Applikation von radioaktivem ¹³¹Jod zerstört werden, während die übrigen Organe weitgehend geschont werden. Diagnostisch steht für NIS-positive Zellen eine spezifische Bildgebung zu Verfügung. Hierbei ist entscheidend, dass das NIS-Protein nicht nur Jodid transportiert sondern auch andere Moleküle wie z.B. den Gamma-Strahler ^{99m}Tc-Technetium-Pertechnetat. Nach Infusion reichert sich ^{99m}Tc in NIS-positiven Geweben an, welche daraufhin per Szintigraphie/SPECT (single photon

emission computed tomography) dargestellt werden können (für eine detailliertere Beschreibung siehe Kapitel 2.6.3.2).

1996 konnte zum ersten Mal die NIS-cDNA geklont werden (Dai et al., 1996). Dies führte zur Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Diagnostik von verschiedenen Tumoren (Heufelder et al., 2001), zudem eröffneten sich völlig neue Möglichkeiten in der In-vivo-Bildgebung von Xenografts.

Durch die Klonierung von stabil NIS-überexprimierenden Tumorzelllinien, können die daraus resultierenden Xenografts mittels ^{99m}Tc -SPECT nicht invasiv dargestellt werden (Schipper et al., 2007). Insbesondere in Kombination mit einer Magnetresonanztomographie (MRT) wird damit eine dreidimensionale Darstellung des Tumors und der Metastasierung im Zeitverlauf *in vivo* ermöglicht. Übertragen auf das Pankreaskarzinom bietet diese Technik die Möglichkeit, die Progression und Metastasierung von orthotopen Xenografts im Mausmodell zu visualisieren.

1.2.3 Zielsetzung Doktorarbeit: zweiter Teil

Die Experimente mit dem NIS-Protein im Rahmen dieser Doktorarbeit dienen der Vorbereitung von späteren Versuchen mit orthotopen Xenografts, um die *in vivo* Funktion von Targetgenen wie WNT5A zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollen zunächst stabil NIS-überexprimierende Pankreaskarzinomzelllinien generiert werden. Verwendet werden die drei Zelllinien Imim-Pc1, PaTu-8988t pBig2R und PaTu-8988t pBig2R/WNT5A. Letztere exprimieren WNT5A konditional reprimierbar durch Zugabe von Doxycyclin. Anschließend sollen mit diesen Zellen an einer kleinen Stückzahl von Thymus-aplastischen Nacktmäusen subkutane Xenografts erstellt werden. Anhand dieser Xenografts, ausreichendes Größenwachstum vorausgesetzt, wird dann eine erste In-vivo-Bildgebung mittels ^{99m}Tc -SPECT durchgeführt. Sollte dies gelingen, wäre hiermit die Basis für weiterführende Experimente gelegt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank Function Line	Heraeus
Dri-Block DB2A	Techne
Electrophoretic Gel System MiniCell Primo	E-C Apparatus Corporation
Electrophoretic Gel System MidiCell Primo	E-C Apparatus Corporation
Feinwaage AE163	Mettler
Gelplatten und –ständer	Bio-Rad
Hämozytometer	Marienfeld
Kühlschrank	Liebherr
Kühlschrank Hera freeze	Heraeus
Kryocontainer „Mr. Frosty“	Nalgene
Mini-Protean Tetra System Blotkammer	Bio-Rad
Mini-Protean Tetra System Gelelektrophorese	Bio-Rad
MR2002 Heizrührgerät	Heidolph
PCR Maschine Progene	Techne
Phasenkontrast Lichtmikroskop	Olympus
PipetBoy acu	Integra Biosciences
Pipette 1-10 µl	Eppendorf
Pipetten 2-20, 20-200 und 100-1000 µl Discovery	HAT
PowerPac HC Spannungsquelle	Bio-Rad
Rüttler Unimax 2010	Heidolph
Schieblehre digital 0-1500 mm	Bochem
Spektrophotometer Nano Drop 1000	peqLab
Sterilbank Lamin Air HB2448	Heraeus
Sterilbank Bio-II-A	Telstar
Stickstoffaufbewahrungsbehälter	Taylor-Wharton Cryogenics
Thermomixer 5436	Eppendorf
Unimax 2010 Rüttler	Heidolph
Vortexer MS1 Minishaker	IKA
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus
Zentrifuge Cryofuge 5000	Heraeus

Zentrifuge Cryofuge 8000	Heraeus
Zentrifuge BioFuge pico	Heraeus
Zentrifuge Mikro200R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Cetrifuge 5415C	Eppendorf
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Combitips (0,2-12,5 ml)	Eppendorf
Einmalhandschuhe Nobaglove Latex	Noba
Einmalhandschuhe Nobaglove Nitril	Noba
Einmal-Injektions-Kanüle 27 G	Sterican [®] , Braun
Einmal-Injektions-Kanüle 26 G	Sterican [®] , Braun
Einmalküvette Ultravette	Brand
Fast Optical 96-Well-Reaction Plate 0,1 ml	Applied Biosystems
Gewebekulturflasche 25, 75 und 175 cm ²	CellStar [®] , Greiner bio-one
Gewebekulturplatte 24-Well	Falcon [®] , Becton Dickinson
Gewebekulturplatte 6-, 12- und 48-Well	Nunc
Gewebekulturplatte 96-Well	CellStar [®] , Greiner bio-one
Objektträger	Menzel
Pipettentips 10, 200 und 1000 µl	Diamond [®] , Gilson
PP-Röhre 13 ml	Sarstedt
PP-Röhrchen 15 und 50 ml	CellStar [®] , Greiner bio-one
PS-Röhrchen 12 ml	CellStar [®] , Greiner bio-one
PS-Einmalküvetten 1,5 ml	Brand
PVDF-Membran	Millipore
Reaktionsgefäß 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipette 2 und 25 ml	CellStar [®] , Greiner bio-one
Serologische Pipette, 5, 10 und 50 ml	Sarstedt
Spritzen 1 ml	BD Plastipak [®] , Becton Dickinson
Whatman Gel Blotting Papier	Schleicher & Schüll
Zellkulturschale 10 cm nunclone surface	Nunc
Zellkulturschale 14,5 cm	CellStar [®] , Greiner bio-one
Zellschaber	CellStar [®] , Greiner bio-one

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders im Methoden-Teil bei der jeweiligen Reagenz vermerkt, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von Amersham Biosciences, AppliChem, Bio-Rad, Carl Roth, Fluka, Merck, Roche Diagnostics, Serva und Sigma Chemie bezogen.

2.1.4 Zellkultur (Nährmedien, Antibiotika, Zusätze, Behandlung)

DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine	PAA Laboratories
Doxycyclin (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS (1 x) without Ca ²⁺ & Mg ²⁺	PAA Laboratories
FBS (Fetal Bovine Serum) Gold	PAA Laboratories
FBS (Fetal Bovine Serum) Tet negative	PAA Laboratories
G-418-Sulphate (50 mg/ml)	PAA Laboratories
Gemcitabine (40 mg/ml)	Gemzar [®] , Lilly
Gentamicin (10 mg/ml)	PAA Laboratories
Hygromycin B Lösung (50 mg/ml)	Roth
Normocin	Amata
Opti-Mem	Gibco
Recombinant murine WNT5A (10 µg/ml)	R & D Systems
TNF-α	R & D Systems
TRAIL	R & D Systems
Trypsin-EDTA (1 x)	PAA Laboratories

2.1.5 Standards

DNA:

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas

Protein:

PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard	Bio-Rad

2.1.6 Reagenziensets (Kits)

Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} [®]	Roche Diagnostics
ECL Western Blotting Detection Reagents [®]	GE Healthcare
Gateway [®] Cloning	Invitrogen
Lipofectamine 2000 Reagent [®]	Invitrogen
NucleoSpin Plasmid [®]	Macherey-Nagel
Omniscript [®] RT Kit (200)	Qiagen

PathScan [®] Phospho-SAPK/JNK ELISA	Cell Signaling
peqGOLD [®] Total RNA Kit	peqLab
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit [®]	Roche Diagnostics
RNase-Free DNase Set	Qiagen
siLentFect [®] Lipid	Bio-Rad
TransFast [®] Transfection reagent	Promega
Transmessenger [®] Transfection Reagent	Qiagen

2.1.7 Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Thermo Start Taq-DNA-Polymerase	Abgene

2.1.8 Vektoren und Expressionskonstrukte

Tab. 2.1.1: Expressionskonstrukte

Name	Insert	Vektor	Herkunft/Referenz
pBig2R			J.R. Hall, The John P. Robarts Research Institute, Ontario, Kanada
pBig2R/WNT5A	WNT5A ORF	pBig2R	selbst hergestellt
pcDNA3.2/V5			Gateway System, Invitrogen
pcDNA3.2/V5/NIS	NIS ORF	pcDNA3.2/V5	selbst hergestellt
pFB-Neo		pFB-Neo	Stratagene
pFB-Neo/CMV-NIS	CMV-NIS	pFB-Neo	Dr. Stefanie Ripka, Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel, Marburg, Deutschland

2.1.9 Oligonukleotide

Tab. 2.1.2: verwendete siRNA

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
hWNT5A_1	5'- GGUUGUAAUUGAAGCCAAUtt- 3'	Ambion
hWNT5A_2	5'- GGACUUUCUCAAGGACAGAtt- 3'	Ambion

Tab. 2.1.3: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz	Restriktionsenzym
hWNT5A ORFfor	5'- <u>GGGGTACCC</u> CATGAAGAAGTCCATT -3'	<u>KpnI</u>
hWNT5A ORFrev	5'- <u>GGACTAGTC</u> CCTACTTGCACACAAA -3'	<u>SpeI</u>

Tab. 2.1.4: Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
hWNT5A_for	5'- GTGGCCCTGCTGTGATCAT -3'
hWNT5A_rev	5'- TTCAACCCAACACGCATTTTC -3'
NIS_for	5'- ATCCTGGATGACAACCTTGGTCAA -3'
NIS_rev	5'- AGAAAAACAGACGATCCTCATTGG -3'
RPLP0_for	5'- GTCGGAGGAGTCGGACGAG -3'
RPLP0_rev	5'- GCCTTTATTTCTTGTTTTGCAAA -3'

2.1.10. Antikörper

Tab. 2.1.5: primäre Antikörper

Antikörper	Ursprungs- organismus	Spezifität	Herkunft/bezogen von
Anti-beta-Aktin	Maus	Mensch, Ratte, Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-PARP	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling
Anti-WNT5A	Ziege	Mensch, Maus	R & D Systems

Tab. 2.1.6: sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus/Spezifität	Herkunft/bezogen von
Anti-Goat IgG	Kaninchen	Dianova
Anti-Mouse IgG	Schaf	GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG	Esel	GE Healthcare

2.1.11 Protein

Tab. 2.1.7: rekombinantes Protein

Bezeichnung	Herkunft
Recombinant murine WNT5A	R & D Systems

2.1.12. Biologisches Material

Tab. 2.1.8: Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
TOP10 Chemically Competent E. coli Cells	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ -

Tab. 2.1.9: Zelllinien

Zelllinie	Abstammung/ Überexpression	Kultivierungs- medium	Herkunft	Referenz
Imim-Pc1	humanes Pankreaskar- zinom/Leber- metastase	DMEM + 10 % FCS	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien	Lab Invest. 72(4): 395- 404 (1995)
Imim-Pc1 RV/NIS	stabile NIS- Überexpression	DMEM + 10 % FCS, G-418 (800 μ g/ml)	selbst hergestellt	
LinX	Retrovirale Verpackungs- zelllinie	DMEM + 10 % FCS	Open Biosystems	Hannon GJ et al., Science 283: 1129- 1130 (1999)
MDA-MB-468	humanes Adenokarzinom der Brust	DMEM + 10 % FCS	CLS (Cell Lines Service)	Cailleau R et al., In Vitro 14: 911-5 (1978)
PaTu-8988t	Humanes Pankreaskar- zinom/Leber- metastase	DMEM + 10 % FCS	DSMZ, Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland	Virchows Archiv B Cell Pathol 61: 295-306 (1992)

PaTu-8988t pBig2R	pBig Leervektor	DMEM + 10 % FCS Hygromycin B (400 µg/ml)	selbst hergestellt	
PaTu-8988t pBig2R/WNT5A	stabile WNT5A- Überexpression	DMEM + 10 % FCS Hygromycin B (400 µg/ml)	selbst hergestellt	
PaTu-8988t pBig2R pcDNA3.2/V5/ NIS	stabile NIS- Überexpression, pBig Leervektor	DMEM + 10 % FCS Hygromycin B (400 µg/ml) G-418 (1200 µg/ml)	selbst hergestellt	
PaTu-8988t pBig2R/WNT5A pcDNA3.2/V5/ NIS	stabile NIS- Überexpression, stabile WNT5A- Überexpression	DMEM + 10 % FCS Hygromycin B (400 µg/ml) G-418 (1200 µg/ml)	selbst hergestellt	
SW-480	humanes Kolonkarzinom	DMEM + 10 % FCS	DSMZ, Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland	Leibovitz et al., Cancer Res 36: 4562-4569 (1976)

Tab. 2.1.10: Mausstämme

Name	Beschreibung	Geschlecht	Herkunft
NMRI Nude Foxn1nu	Thymus-aplastischer Auszucht Nacktmausstamm	Weiblich	Charles-River WIGA

2.2 Proteinbiochemie

2.2.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zelllinien

Zunächst wird das Kulturmedium von den adhärennten Zellen abgenommen. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen und in einer adäquaten Menge Lysepuffer,

nachdem sie mittels eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst wurden, in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis werden die Zelltrümmer bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Proteine befinden sich nun im Überstand, welcher abgenommen und bei -20 °C gelagert wird.

Lysepuffer (500ml):

25	ml	1 M HEPES pH 7,4
15	ml	5 M NaCl
2,5	ml	200 mM EGTA
50	ml	100% Glycerin
5	ml	TritonX-100
2,1	g	NaF
2,23	g	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O
1		Complete Protease Inhibitor Tablette (Roche Diagnostics) pro 10 ml frisch dazugeben

1 x PBS:

8	g	NaCl
0,2	g	KCl
1,44	g	Na ₂ HPO ₄
0,24	g	KH ₂ PO ₄
pH 7,4, auf 1000 ml H ₂ O		

2.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

BIO-RAD Protein Assay Reagenz wird (Bio-Rad) 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Für die spätere Konstruktion der Eichgerade wird die verdünnte BIO-RAD Reagenz mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin versetzt, so dass Konzentrationen von 0 (Blank), 1, 2 und 4 µg/ml entstehen (Standards). Von dem zu analysierenden Protein-Lysat werden 2 µl zu 800 µl verdünntem BIO-RAD pipettiert (Probe). Von Blank, Standards und Probe werden je 2 mal 400 µl in eine geeignete Photometer-Küvette überführt (Doppelbestimmung). Die Messung der Absorption erfolgt bei OD 600.

Die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 (in der BIO-RAD Reagenz enthalten) an Proteine verschiebt das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Proteinkonzentration der Probe kann anhand einer Eichgerade, die mit Hilfe von Blank und Standards erstellt wurde, ermittelt werden.

2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Durch die SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt.

Das Detergenz SDS bildet mit den meisten Proteinen Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es denaturiert Proteine und verhindert die Ausbildung von Quartärstrukturen. Damit wird die Eigenladung der Proteine maskiert. Bei der Gelelektrophorese trennt der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf (kleine Proteine wandern schneller als große). Im verwendeten pH-Bereich sind alle SDS-Protein-Komplexe negativ geladen, d.h. sie wandern während der Elektrophorese zur Anode.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 %ige Trenngelle verwendet.

Für die SDS-PAGE werden die Proben mit einem 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und auf das Sammelgel geladen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer mit einer Spannung von 75 V im Sammelgel und von 140 V im Trenngel.

Die Proteine werden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert.

5 x SDS-Probenpuffer:

250	mM	Tris/HCL pH 6,8
500	mM	DTT
10	%	SDS
0,5	%	Bromphenolblau
50	%	Glycerol

Trenngelpuffer:

1,5	M	Tris/HCL pH 8,8
-----	---	-----------------

Trenngel (10%):

4,1	ml	H ₂ O
2,6	ml	Trenngelpuffer
3,3	ml	30% Acrylamid
100	µl	10% SDS
50	µl	10% APS
10	µl	TEMED

Sammelgelpuffer:

0,5	M	Tris/HCL pH 6,8
-----	---	-----------------

Sammelgel:

3	ml	H ₂ O
1,3	ml	Sammelgelpuffer
750	µl	30% Acrylamid
50	µl	10% SDS
30	µl	10% APS
10	µl	TEMED

1 x SDS-Laufpuffer:

200	mM	Glycin
25	mM	Tris
0,1	%	SDS

2.2.4 Transfer von Protein auf eine Membran (Western Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Gel können Proteine mittels einer angelegten Spannung auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

Dazu wird die Membran zunächst in Methanol aktiviert. Gel und Membran werden daraufhin im Transblot-Puffer zwischen Whatman-Papieren so geschichtet, dass die negativ geladenen Proteine (in Richtung Anode) auf die PVDF-Membran transferiert werden. Der Protein-Transfer erfolgte in einer Blotkammer bei 75 V über 1 h.

Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen („Blocken“), wird die Membran 1 h bei Raumtemperatur (bzw. bei 4 °C über Nacht) in 5 %igem Milchpulver (in 1 x TBST) auf dem Rüttler inkubiert.

Transblot-Puffer (1000 ml):

14,4	g	Glycin
3	g	Tris
100	ml	Methanol

1 x TBST:

1	x	TBS-Puffer
0,1	%	Tween [®] 20

10 x TBS:

1,4	M	NaCl
25	mM	KCl
250	mM	Tris
pH 7,4		

2.2.5 Immunfärbung (Immunoblot)

Um Proteine auf einer geblockten PVDF-Membran mit Antikörpern anzufärben, wird diese zuerst mit einem Protein-spezifischen Antikörper (1. oder primärer Antikörper) 1 h bei Raumtemperatur (bzw. bei 4 °C über Nacht) inkubiert. Danach wird die Membran dreimal mit 1 x TBST für je 10 min gewaschen. Dies entfernt nicht- und unspezifisch gebundene Antikörper. Nach dem „Waschen“ wird die Membran mit einem zweiten gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper (2. oder sekundärer Antikörper) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. An den sekundären Antikörper ist die HRP (Horseradish-Peroxidase) gekoppelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen kann die Proteinbande über die ECL-Reaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden/Genomics

2.3.1 DNA

2.3.1.1 Einige grundlegende Methoden im Überblick

Polymerase Kettenreaktion (PCR):

Die PCR ist eine Methode, mit deren Hilfe man Nukleinsäuren amplifizieren kann. Dazu benötigt man im Prinzip nur Ausgangs-DNA (Template), ein Paar passender Oligonukleotid-Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) sowie Puffer und Nukleotide. Das Standard-PCR-Programm besteht aus drei Schritten.

1. Denaturierungsschritt:

Die Probe wird auf 94 °C erhitzt (denaturiert). Bei dieser Temperatur trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA.

2. Annealing-Schritt:

Nach der Denaturierung wird die Probe je nach verwendetem Primerpaar auf 55 - 65 °C heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur hybridisieren die massiv im Überschuss vorhandenen Oligonukleotid-Primer auf die einzelsträngige Template-DNA. Abhängig vom GC-Gehalt der Primer kann die Temperatur für den Annealing-Schritt variiert werden. Die ideale Annealing-Temperatur muss im Einzelfall für jedes Primer-Paar über eine Gradienten-PCR ermittelt werden.

3. Elongationsschritt:

Bei 72 °C hat die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum. Jetzt verlängert sie die Oligonukleotid-Primer, so dass am Ende des Zyklus wieder doppelsträngige DNA vorliegt.

Bei der PCR werden mehrere Zyklen aneinander gereiht. Im Prinzip verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Ausgangs-DNA. Während der ersten Zyklen überwiegen allerdings noch längere DNA-Produkte. Die DNA-Fragmente der erwarteten Länge nehmen erst nach 4-5 Zyklen überhand.

Restriktion von DNA:

Für das Spalten von linearer und zyklischer DNA werden sogenannte Restriktionsendonukleasen benutzt. Diese Enzyme werden in drei Klassen eingeteilt. Molekularbiologisch von Bedeutung sind lediglich Enzyme der Klasse II. Diese erkennen spezifisch vier bis acht Basenpaare und schneiden unter den richtigen Pufferbedingungen an genau definierbaren Stellen. Die Enzyme produzieren entweder Fragmente mit glatten Enden („blunt ends“) oder mit einem Überhang („sticky ends“ mit 5'-Phosphat oder 3'-OH Überhang).

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen (Puffer und Temperaturen) eingehalten. Die Menge des eingesetzten Enzyms wurde bei 1/10 des Gesamtansatzes gehalten.

Dephosphorylierung der Vektor-DNA durch CIP („CIPen“):

Durch das Enzym CIP können 5'-Phosphat-Reste, die durch den Restriktionsverdau der Vektor-DNA entstanden sind, entfernt werden. Dies ist nötig, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Ein nicht CIP-behandeltes DNA-Fragment kann allerdings immer noch mit dem Vektor ligieren.

Ligation von DNA-Fragmenten:

DNA Fragmente, die durch den Verdau mit den gleichen Restriktionsenzymen entstanden sind, können über spezielle Enzyme („Ligasen“) zusammengefügt werden. Die Ligation erfolgt dabei über das ATP-abhängige Knüpfen von Phosphodiesterbindungen.

In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase aus dem Rapid DNA Ligation Kit der Firma Roche verwendet.

Transformation von E. coli Bakterien:

Kompetente E. coli Stämme sind in der Lage DNA aufzunehmen („Transformation“) und diese mit sich selbst zu vermehren. Bakterien, die DNA bzw. ein Plasmid

aufgenommen haben, wachsen bei der Inkubation über Nacht auf einem Antibiotika-Agar an (die Antibiotika-Resistenz ist Teil des transformierten DNA-Konstruktes). Bakterien, die das Konstrukt mit der Antibiotika-Resistenz nicht aufgenommen haben, wachsen nicht an.

Zur Vervielfachung des Konstruktes kann nun eine 5 ml Übernachtkultur mit Selektionsantibiose mit einer der kompetenten Bakterienkolonien von dem Agar angeimpft werden.

Isolierung von Plasmid-DNA:

Plasmid-DNA kann über alkalische Lyse und Aufreinigung an einer „silica membrane“-Säule isoliert werden („Mini-Präp“).

In dieser Arbeit wurde der NucleoSpin Plasmid Kit[®] verwandt.

Agarosegelelektrophorese:

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein Mittel zum Auftrennen von DNA-Fragmenten einer Größe von 0,5 bis 25 kb dar. Durch die negativen Phosphatgruppen der DNA-Fragmente bewegen diese sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit abhängig von der Größe des Fragments sowie von der angelegten Spannung, der Konformation der DNA und der Agarosekonzentration. Die verschiedenen DNA-Fragmente können mit Ethidiumbromid als Banden sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen von DNA und RNA (Interkalation). Dadurch verändert sich sein Anregungsspektrum. Unter Anregung mit UV-Licht fluoresziert die Substanz nun stark.

In dieser Arbeit wurden 1%ige TBE-Agarosegele mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwandt. Aufgetrennt wurde bei 80-120 mV. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

Agarosegel:

0,5	g	Agarose
50	ml	1 x TBE-Puffer

5 x TBE-Puffer:

54	g	TrisBase
27,5	g	Borsäure
4	ml	EDTA (0,25M)
auf 1 l Aqua dest.		

Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration von DNA wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm durch ein Spektralphotometer bestimmt. Die Messung erfolgte in UV-durchlässigen Einmalküvetten gegen einen Leerwert (Blank) der dem Puffer entsprach, in dem die DNA gelöst war. Eine relative OD von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA.

2.3.1.2 Klonierung des Expressionskonstruktes pBig2R/WNT5A

Zur Erstellung des Expressionskonstruktes pBig2R/WNT5A wurde die WNT5A-ORF ("Open Reading Frame") in das reprimierbare Plasmid pBig2R (J.R. Hall, The John P. Roberts Research Institute, Ontario, Kanada) kloniert. Durch die Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin kann die exogene WNT5A-Produktion über den Vektor unterdrückt werden. Als Template für die Amplifikation der WNT5A-ORF diente der „humane cDNA clone MGC:71588 IMAGE:30346200“, als Primer „hWNT5A ORFfor“ und „hWNT5A ORFrev“. Über eine Gradienten-PCR wurde die entsprechende Annealing-Temperatur ermittelt.

Primer:

hWNT5A ORFfor 5'- GGGGTACCCCATGAAGAAGTCCATT -3', KpnI

hWNT5A ORFrev 5'- GGACTAGTCCCTACTTGCACACAAA -3' SpeI

PCR-Ansatz:

38	µl	H ₂ O
3	µl	MgCL ₂
1	µl	dNTP's
5	µl	Thermo Start Puffer 10 x
0,5	µl	hWNT5A ORFfor (20 pmol)
0,5	µl	hWNT5A ORFrev (20 pmol)
1	µl	Template (EST Clone)
1	µl	Thermo Start Polymerase

PCR-Programm:

95	°C	8 min	
95	°C	30 sec	
56	°C	30 sec	40 x
72	°C	1 min	
72	°C	2 min	dann weiter bei 4 °C

Anschließend wurden sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Vektor-DNA wurde zusätzlich noch mit CIP dephosphoryliert.

Verdau Template WNT5A (ORF):

7	µl	Template
1	µl	Puffer 1 (NEB System)
1	µl	BSA
0,5	µl	Kpn1
0,5	µl	Spe1
		1,5 h Inkubation bei 37 °C

Verdau Vektor (pBig2R):

5	µl	pBig2R
2	µl	H ₂ O
1	µl	Puffer 1
1	µl	BSA
0,5	µl	Kpn1
0,5	µl	Spe1
		1,5 h bei 37 °C
1	µl	CIP
		1 h bei 37 °C

Template und Vektor wurden nach der Restriktion mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit aus einem Kontrollgel aufgereinigt.

Die Ligation von WNT5A-ORF und pBig2R erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit[®] nach Protokoll. Das Verhältnis von eingesetzter Vektor-DNA zu Template-DNA betrug 1 : 2.

Mit dem Ligationsansatz wurden E. coli Bakterien (TOP10 chemically competent) transformiert.

Transformation E. coli TOP10:

100	µl	E.coli TOP10
10	µl	Ligationsansatz
		30 min auf Eis
		45 sec bei 42 °C
		2 min auf Eis
300	µl	LB (ohne Antibiotikum)
		1 h bei 37 °C

Ausplattieren auf LB-Agarplatten (+ Ampicillin) über Nacht bei 37 °C

LB-Agarplatten:

10	g	Typton
5	g	Hefe-Extrakt
10	g	NaCl
15	g	Bacto-Agar
1000	ml	H ₂ O
		100 µg/ml Ampicillin nach Bedarf

Mit den erhaltenen E. coli Kolonien wurden 5 ml LB-Übernachtskulturen (+ Ampicillin) angeimpft.

5 ml LB-Übernachtskulturen:

5	ml	LB-Medium
5	µl	Ampicillin (50 mg/ml)
1		E. coli Kolonie

LB-Flüssigmedium:

10	g	Typton
5	g	Hefe-Extrakt
10	g	NaCl
1000	ml	H ₂ O
		100 µg/ml Ampicillin nach Bedarf

Ausgehend von den 5 ml Übernachtskulturen wurde die Konstrukt-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid® Kit isoliert (Mini-Präp).

Das isolierte Expressionskonstrukt pBig2R/WNT5A wurde durch einen Restriktionsverdau mit kpn I und spe I auf seine Richtigkeit hin überprüft.

2.3.1.3 Klonierung des Expressionskonstruktes pcDNA3.2/V5/NIS

Zur Erstellung des Expressionskonstruktes pcDNA3.2/V5/NIS wurde die NIS-ORF in den pcDNA3.2/V5 Vektor kloniert (Invitrogen, Gateway Technology).

Als Template für die Amplifikation der NIS-ORF diente das Konstrukt pADTrack CgA NIS (freundlicherweise überlassen von German Horn, Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel, Marburg, Deutschland).

Primer:

Gateway NIS Start

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGGAGGCCGTGGAGACC3'

Gateway NIS Stop

5'GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGAGGTTTGTCTCCTGCTGGT3'

PCR-Ansatz:

38	µl	H ₂ O
3	µl	MgCL ₂
1	µl	dNTP's
5	µl	ThermoStar Puffer 10x
0,5	µl	Gateway NIS Start Primer (1:20)
0,5	µl	Gateway NIS Stop Primer (1:20)
1	µl	pADTrack CgA NIS
1	µl	ThermoStar Polymerase

PCR-Programm:

95	°C	8 min	
95	°C	30 sec	
56	°C	30 sec	40x
72	°C	2 min	
72	°C	2 min	dann weiter bei 4 °C

Das Amplifikationsprodukt wurde über eine Agarosegelelektrophorese und den QIAquick® Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Um das endgültige Expressionskonstrukt zu erhalten, wurde das Amplifikationsprodukt durch Rekombination (bacteriophage lambda site-specific recombination system)

zunächst in einen „entry vector“ und dann in den endgültigen Zielvektor (pcDNA3.2/V5) kloniert (Gateway[®], Invitrogen).

Die Transformation in E. coli-Bakterien und die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

Angeschlossen wurde ein Probeverdau von pcDNA3.2/V5/NIS mit Bgl2.

2.3.2 RNA

2.3.2.1 Isolierung von RNA aus Zelllinien oder Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien oder Geweben erfolgte auf Basis des peqGOLD[®] Total RNA Kit (TRK) nach Protokoll.

Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zermörsert, bevor es in TRK-Lysepuffer aufgenommen wurde.

Gewebekulturzelllinien wurden direkt in der Schale bzw. Flasche ohne vorheriges Trypsinieren oder Waschen (um RNase Kontamination vorzubeugen) mit TRK-Lysepuffer lysiert.

Ein zusätzlicher DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) wurde in das Protokoll eingeflochten.

2.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

RNA-Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer bestimmt (NanoDrop 1000, peqLab).

2.3.2.3 Synthese von cDNA (reverse Transkription)

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Ansatz für die First-Strand-Synthese:

1	µl	RT-O
0,5	µl	RNase-Inhibitor
0,4	µl	Oligo dT Primer
2	µl	dNTP's
2	µl	10 x RT-Puffer
1	µg	RNA

mit H₂O (RNase frei) auf 20 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, danach auf Eis

Anschließend wurde der Ansatz 1:10 mit H₂O (RNase frei) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.3.2.4 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt eine Quantifizierung der Nukleinsäureamplifikation auf Basis einer PCR. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen kann zwischen den Zyklen die Nukleinsäurekonzentration bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I verwendet. Dieses bindet an doppelsträngige DNA. Die Konzentration des resultierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes kann daraufhin bestimmt werden. Als Referenzgen diente das ribosomale Protein RPLP0.

Durchgeführt wurde die Messung mit dem 7500 Fast Real Time PCR System.

Ansatz:

18	µl	Master Mix
2	µl	cDNA (1:10)

Master Mix (10 Proben):

100	µl	SYBR
5	µl	Primer for
5	µl	Primer rev
90	µl	H ₂ O (RNA und RNase frei)

Primer:

$C_{\text{PRIMER}} = 20 \text{ pmol}/\mu\text{l}$

$C_{\text{ZIEL}} = 0,05 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 10 pmol für 200 µl Ansatz

5 µl Primer 1:10 mit H₂O verdünnt pro 10 x Master Mix

Zur Auswertung wurden alle Werte in Relation zur Expression des Haushaltsgens RPLP0 gesetzt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Nährmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Dieses wurde mit 10 % FCS und Gentamicin (50 µg/ml) versetzt.

2.4.1.2 Subkultivierung von Zellen

Adhärente Zelllinien können in geeigneten Gefäßen (Kulturflaschen) in Kultur gehalten werden. In dieser Arbeit wurden Zelllinien bedeckt von 0,2 ml Medium pro cm² im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Ihr Wachstum wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Um zu vermeiden, dass die Zellen konfluent werden, d.h. dass sie den gesamten Boden der Zellkulturflasche lückenlos bewachsen, wurden die Zellen durch Passagieren („splitten“) subkultiviert, und zwar kurz bevor sie konfluent waren.

Dazu wurden sie zunächst mit Dulbecco's 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 1 x Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vollständig vom Gefäßboden gelöst hatten. Um das Trypsin zu neutralisieren, wurde daraufhin sogleich frisches serumhaltiges Medium in mindestens gleicher Menge zugeführt. Je nach Zelldichte wurde die Suspension noch weiter mit Medium verdünnt und in ein neues Gefäß überführt.

2.4.1.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Zellen können zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden.

Hierzu wurde eine entsprechende Menge an Zellsuspension zusammen mit 10 % DMSO in ein 2 ml Kryogefäß gegeben und sogleich in einem Kryo-Container (gefüllt mit 100 % 2-Propanol, um eine Abkühlung von 1 °C pro Minute zu gewährleisten) in einem Eisschrank bei -80 °C gelagert. Nach 24 h wurden die Zellen in ein Stickstoffaufbewahrungsbehältnis überführt.

2.4.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung in Zellsuspensionen wurde ein Neubauer-Hämozytometer benutzt.

Dabei wurde eine geeignete Menge an Zellsuspension (etwa 10 µl) mit einer Pipette zwischen Deckglas und Objektträger in die Zählkammer eingebracht. Durch das Auszählen aller Zellen aus allen 4 Eckquadraten und die Bildung des Mittelwerts ergab sich die Zellzahl in 0,1 µl.

2.4.2 Transfektion von Zelllinien

2.4.2.1 Transfektion von siRNA (small interfering RNA)

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet einen Mechanismus in eukaryontischen Zellen, über den, vermittelt durch kleine doppelsträngige RNA Moleküle, die Aktivität von Genen kontrolliert werden kann. Eine zentrale Rolle spielen hierbei das Enzym Dicer, das die endogene oder exogene dsRNA zu kleinen 21mer-langen small-interfering

RNAs (siRNAs) schneidet, und der RISC (RNA-induced-silencing-complex). Über die Interaktion von kurzen RNA-Molekülen insb. siRNA und Argonaute-Proteinen im RISC können komplementäre mRNAs degradiert werden.

Durch spezielle Reagenzien können Zellen mit synthetisch hergestellter siRNA transfiziert werden, wodurch die Expression eines bestimmten Proteins ausgeschaltet werden kann.

In dieser Arbeit wurden zur Transfektion, in Abhängigkeit von den Erfahrungen mit der jeweiligen Zelllinie, die Reagenzien TransMessenger® und siLentFect Lipid Reagent® verwendet. Transfiziert wurde stets nach Hersteller-Protokoll.

2.4.2.2 Transfektion von DNA

Die Transfektion von DNA-Expressionskonstrukten erfolgte mit Transfast® oder Lipofectamine 2000® nach Protokoll des Herstellers.

2.4.2.3 Retrovirale Expressionssysteme und Infektion von Zielzellen

In dieser Arbeit wurde das „LinX retroviral expression system“ (Open Biosystems) verwendet.

LinX-Zellen sind von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) abgeleitet. In sie wurden die env (Hüllproteine)-, pol (Proteasen, reverse Transkriptase und Integrase)- und gag (Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine)-Gene, die für die Formation und Replikation von RV notwendig sind, stabil integriert. Die produzierten Viren sind nicht replikationsfähig aber dennoch infektiös.

Werden LinX-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der das virale Verpackungssignal („viral packaging signal Ψ “) enthält, wird dieser zusammen mit dem viralen Genom in infektiöse Viren verpackt.

Die gewünschte Zielzelllinie kann mit dem Überstand der transfizierten LinX-Zellen durch Spininfektion infiziert werden.

2.4.3 Herstellung und Kultivierung stabiler Zelllinien

2.4.3.1 PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A

Je 1×10^6 Zellen PaTu-8988t wurden in einer 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und am folgenden Tag mit Lipofectamine 2000® mit pBig2R bzw. pBig2R/WNT5A nach Protokoll transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe ins 6-Well Format überführt. Wiederum nach 24 h wurde das Selektionsmedium (DMEM, 10 % FCS ohne Tet, Gentamicin 50µg/ml, Hygromycin 400 µg/ml) hinzugegeben. Nach einigen Tagen wurden Klone, die das Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert hatten, in das 24-Well Format vereinzelt und weiter in Kultur gehalten.

Die Funktionsfähigkeit des Expressionskonstruktes wurde durch einen Western-Blot mit und ohne Repression des Konstruktes durch Doxycyclin (4 µg/ml) getestet.

2.4.3.2 PaTu-8988t pBig2R pcDNA3.2/V5/NIS und PaTu-8988t pBig2R/WNT5A pcDNA3.2/V5/NIS

Verfahren wurde wie im vorangehenden Absatz beschrieben. Zusätzlich wurde mit Neomycin (G418, 1200µg/ml) selektioniert.

Die Funktionsfähigkeit des Expressionskonstruktes wurde über eine qRT-PCR und einen ^{99m}Tc-Scan kontrolliert.

2.4.3.3 Imim-Pc1 RV/NIS

LinX-Zellen wurden in einer 60 mm Zellkulturschale in Medium (DMEM, 10 % FCS, ohne Antibiotika) ausgesät. Am nächsten Tag folgte die Transfektion mit dem retroviralen Vektor pFB-Neo/CMV-NIS (der NIS-ORF wurde ein CMV-Promoter vorangeschaltet). Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000[®] nach Protokoll mit einem Mediumwechsel nach 4 h (auf DMEM, 10 % FCS, 50 µg/ml Gentamicin). Nach 48 h konnte der Überstand für die Spininfektion benutzt werden.

Imim-Pc1-Zellen wurden in einer 6-Well Gewebekulturplatte ausgesät, so dass sie am Tag der ersten Spininfektion zu 40-50 % konfluent waren. Zur Infektion wurden 5 ml Überstand von den transfizierten LinX-Zellen mit einer Spritze abgenommen und durch einen 0,48 µm Filter (um Zellen zurückzuhalten) auf die Imim-Pc1-Zellen zu 2 ml bereits vorgelegtem frischem Medium (DMEM, 10 % FCS, 50 µg/ml Gentamicin) gegeben. 8 µg/ml Polybrene wurden hinzugegeben, um dem Virus die Überwindung der Zellmembranbarriere zu erleichtern. Daraufhin wurde die Gewebekulturflasche 1 h bei 1500 rpm und 37 °C zentrifugiert. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt. Die Spininfektion wurde am folgenden Tag noch einmal wiederholt. Zur Selektion wurde verfahren wie in 2.4.3.1 beschrieben. Als Selektionsantibiotikum diente G418 (800µg/ml).

Die Funktionsfähigkeit der stabil NIS-überexprimierenden Imim-Pc1 RV/NIS-Klone wurde durch eine qRT-PCR Analyse und einen ^{99m}Tc-Scan sichergestellt.

2.4.3.4 Durchführung eines ^{99m}Tc-Scans von stabil NIS-überexprimierenden Zelllinien

^{99m}Tc-Scans im 6-Well Format eignen sich dazu, die Funktionsfähigkeit des NIS-Proteins in den stabil überexprimierenden Zelllinien zu überprüfen.

Am Vortag des Versuchs wurden 10⁶ Zellen der entsprechenden Zelllinie pro Well ausgesät. Diese wurden vor dem ^{99m}Tc-Scan mit je 1 ml Medium, das 1 Mbq ^{99m}Tc enthielt, inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml Medium ohne ^{99m}Tc wurde ein planarer Scan mit einer SPECT-fähigen 2-Kopf-Gamma-Kamera (ECAM, Siemens)

durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die Definition von „regions of interest“ (ROI) mittels der Syngo-Software (Siemens). Über einen 1 MBq Standard konnte der prozentuale ^{99m}Tc -Uptake ermittelt werden.

Die ^{99m}Tc -Scans wurden freundlicherweise von Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt.

2.5 ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

2.5.1 Cell Death Detection ELISA^{PLUS}® (Roche Diagnostics)

Der Cell Death Detection ELISA (CDD-ELISA) misst die Apoptoserate, indem er zytoplasmatische Histon-assoziierte DNA-Fragmente in einem Zelllysate quantifiziert.

Der CDD-ELISA wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte mit einer Apoptose-induzierenden Substanz behandelt. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert, bis sich die Zellen als Pellet abgesetzt hatten. Der Überstand, in dem sich die Reste der nekrotischen Zellen befinden, wurde verworfen. Die verbliebenen Zellen wurden nun lysiert, um die zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmente freizusetzen. Durch nochmaliges Zentrifugieren wurden diese von den verbliebenen Zellkernen und -trümmern getrennt.

Der Überstand wurde zusammen mit einem Anti-Histon-Biotin- und einem Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper auf einer Streptavidin beschichteten Platte inkubiert. Der Anti-Histon-Biotin-Antikörper bindet den Histon-Teil der fragmentierten DNA und über das Biotin an die Streptavidin beschichtete Platte. Der Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper heftet an den DNA-Teil des entstandenen Komplexes. Nachdem durch mehrmaliges Waschen nicht- und unspezifisch gebundene Antikörper entfernt wurden, kann über die Zugabe eines Substrates (ABTS) die Apoptoserate photometrisch bestimmt werden (photometrischer „sandwich“ ELISA). Die Messung erfolgte an einem ELISA-Reader bei 405 und 490 nm.

2.5.2 PathScan[®] Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling)

Mit diesem ELISA kann der phosphorylierte und damit aktivierte Anteil der SAPK/JNK bestimmt werden. Der SAPK/JNK-ELISA wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die entsprechend dem Versuchsaufbau vorbehandelten Zellen wurden lysiert und nach Zentrifugation wurde der Überstand in die im Kit enthaltenen „microwells“ überführt.

Dort wird die Gesamtmenge von SAPK/JNK im Zelllysate am Boden des mit Anti-SAPK/JNK beschichteten „microwell“ gebunden. Nach mehrmaligem Waschen wird nun der phosphorylierte Anteil von SAPK/JNK über den „Phospho-SAPK/JNK

(Thr183/Tyr185) Detection“-Antikörper markiert und nach Inkubation mit dem sekundären „Anti-rabbit IgG HRP-linked“-Antikörper durch eine enzymatische Reaktion (TMB-Substrat) photometrisch bestimmt.

Die Messung erfolgte an einem ELISA-Reader bei 450 nm. Als Positivkontrolle diente ein Lysat von TNF- α behandelten Zellen.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an weiblichen Thymus-aplastischen Nacktmäusen des Stammes NMRI-Foxn1nu (Charles-River WIGA) durchgeführt. Gehalten wurden die Tiere im Tierstall der Klinik für Nuklearmedizin und Klinik für Radiologische Diagnostik der Universität Marburg unter der Aufsicht eines ausgebildeten Tierpflegers.

Die Versuche starteten im Alter von ca. 4-6 Wochen. Nach Abschluss der Versuche wurden die Mäuse zur Tumorentnahme durch zervikale Dislokation in Isofluran-Narkose getötet.

2.6.2 Subkutane Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäuse

2.6.2.1 Vorbereitung der Zellen

Von konfluenten Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen in einer 75 cm² Gewebekulturflasche wurde das Wachstumsmedium mittels Aspiration abgenommen. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig von der Oberfläche abgelöst hatten, wurde die Trypsin-Reaktion mit 2 ml serumhaltigem DMEM gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Mit Hilfe eines Hämocytopeters wurde die Gesamtzellzahl bestimmt.

Im 15 ml PP-Röhrchen wurde die Zellsuspension für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Nach abermaligem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in einer definierten Menge DMEM ohne Zusätze aufgenommen, sodass eine Konzentration von 10⁶ Zellen auf 100 μ l erreicht wurde.

Bis zur Injektion wurden die Zellen auf Eis gekühlt.

2.6.2.2 Injektion der Zellen

Die Zellsuspension wurde nochmals gut gemischt und in einer 1 ml Spritze aufgenommen. Die subkutane Injektion erfolgte mit einer 26 G (2``) Kanüle in eine Hautfalte der rechten Flanke (um bei der späteren Bildgebung Überlagerungen mit

dem Magen zu verhindern, siehe auch 2.6.3.2) von Nacktmäusen des Stammes NMRI-Foxn1nu.

2.6.2.3 Kontrolle des Tumorwachstums

Das Tumorwachstum wurde mittels einer digitalen Schieblehre wöchentlich in drei Ebenen kontrolliert. Nach 4-6 Wochen hatten die Imim-Pc1 RV/NIS-Tumore eine ausreichende Größe (etwa 1 cm³) für die In-vivo-Bildgebung erreicht.

2.6.3 In-Vivo-Bildgebung an NIS-positiven Zelllinien

2.6.3.1 Betäubung der Tiere

Für die Szintigraphie wurden die Tiere durch eine s.c. Injektion von 70 µl eines 1:2,5 Gemisches aus Xylazin (Rompun[®], 20 mg/ml) und Ketamin (Ketanest[®], 50 mg/ml) in die Nackenfalte betäubt.

2.6.3.2 Bildgebung mit ^{99m}Tc-Szintigraphie/SPECT

Als Szintigraphie bezeichnet man eine Art der nuklearmedizinischen Bildgebung. Zur Erstellung eines Szintigramms wird ein radioaktiver Stoff in den Körper eingebracht, der sich spezifisch im jeweiligen Zielorgan anreichert. Über eine sog. Gamma-Kamera kann die Verteilung dieses Stoffes sichtbar gemacht werden. Eine Rotationsbewegung der Gamma-Kamera ermöglicht es, die Anreicherung des radioaktiven Stoffes in mehreren Ebenen sichtbar zu machen (SPECT, Single Photon Emission Computed Tomography).

Das metastabile Technetium-Isotop ^{99m}Tc ist ein Gamma-Strahler (140 keV) mit einer Halbwertszeit von 6 h und wird spezifisch von NIS-positiven Zellen (physiologisch reichern der Magen, die Speicheldrüsen und die Schilddrüse ^{99m}Tc an) aufgenommen. Dies macht man sich in der Nuklearmedizin vor allem bei der Schilddrüsen-Szintigraphie zu Nutzen.

Mit dieser Art der Bildgebung werden auch die stabil NIS-überexprimierenden Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen als Xenograft im Mausmodell erfasst.

Zur Durchführung eines ^{99m}Tc-Scans wurden die Mäuse mit ausreichend großen subkutanen Tumoren zunächst betäubt, bevor den Tieren 100 µl einer physiologischen Kochsalzlösung mit 18 MBq ^{99m}Tc in die Schwanzvene injiziert wurden. Die Bildgebung erfolgte im Anschluss.

Sowohl die Applikation von ^{99m}Tc als auch die Bildgebung wurden von Mitarbeitern der Nuklearmedizin durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse: erster Teil

3.1.1 Effekte von WNT5A auf die TRAIL induzierte Apoptose in Gewebekulturzelllinien verschiedener Tumorentitäten

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es in der Literatur verschiedene Berichte über divergierende Effekte von WNT5A auf die Tumorprogression von unterschiedlichen Tumorentitäten (Dejmek et al., 2005a; Ripka, 2007; Ripka et al., 2007; Säfholm et al., 2006). Das wirft die Frage auf, ob eine Behandlung mit siRNA gegen WNT5A (siWNT5A) in Zellsystemen verschiedener Tumorentitäten auch gegensätzliche Effekte auf die TRAIL-induzierte Apoptoserate hat.

Um dies zu überprüfen wurden die Pankreaskarzinom-Zelllinie PaTu-8988t, die Kolonkarzinom-Zelllinie SW-480 und die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 jeweils mit siWNT5A behandelt, mit dem Ziel die WNT5A-Expression zu reprimieren.

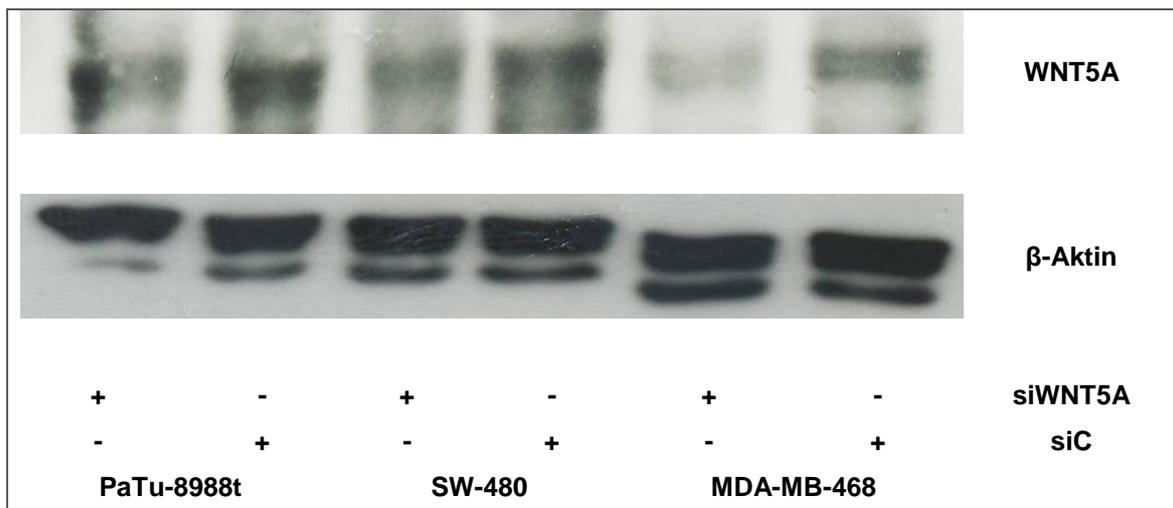


Abb. 3.1.1: Western Blot PaTu-8988t, SW-480 und MDA-MB-468 auf WNT5A nach Behandlung mit siRNA gegen WNT5A (siWNT5A) bzw. nicht-wirksamer Kontroll siRNA (siC). Man erkennt eine deutlich verminderte Expression von WNT5A-Protein nach Behandlung mit siWNT5A.

Anschließend wurde in den drei Zelllinien die basale bzw. TRAIL-induzierte Apoptoserate nach Behandlung mit siWNT5A/siC mittels eines Cell Death Detection ELISA gemessen.

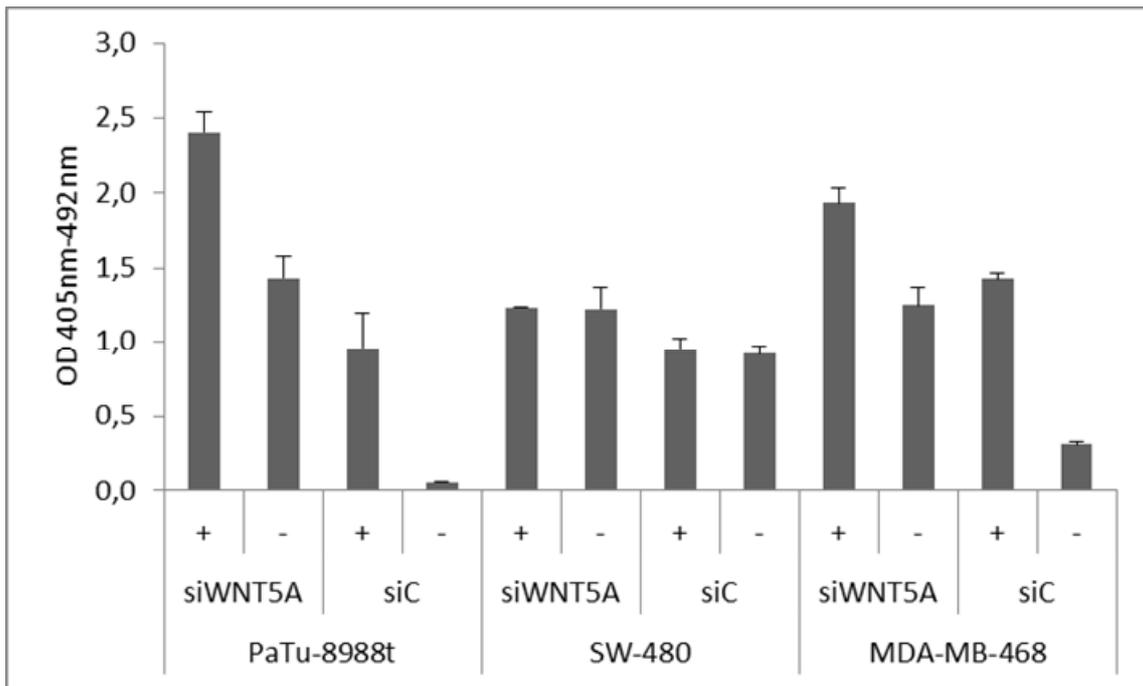


Abb. 3.1.2: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t, SW-480 und MDA-MB-468 siWNT5A/siC, +/- TRAIL (75 ng/ml). Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Betrachtet man die Pankreaskarzinom-Zelllinie PaTu-8988t, so steigen sowohl die Trail-induzierte als auch die basale Apoptoserate unter Behandlung mit siWNT5A an. Gleiches gilt für die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468.

Die Kolonkarzinom-Zelllinie SW-480, bei der auch der knock-down von WNT5A relativ gering ausgeprägt war (Abb. 3.1.1), zeigt nur einen moderaten Anstieg der Apoptoserate nach siWNT5A-Applikation im Vergleich zu siC, ein TRAIL-induzierter Apoptoseanstieg ist zudem nicht zu erkennen.

Weder die Kolonkarzinom-Zelllinie SW-480 noch die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 verhält sich gegensätzlich zur Pankreaskarzinom-Zelllinie PaTu-8988t. Im Gegenteil: die MDA-MB-468-Zellen zeigen den gleichen Anstieg von basaler und TRAIL-induzierter Apoptoserate nach siWNT5A-Applikation wie die PaTu-8988t-Zellen. Während der knock-down von WNT5A in der Zelllinie SW-480 keinen eindeutigen Effekt auf die Apoptose zeigte, wirkt das endogene WNT5A in PaTu-8988t und MDA-MB-468 klar antiapoptotisch. Damit konnten in Hinblick auf die Apoptosesuszeptibilität keine divergierenden Effekte von WNT5A auf diese Zelllinien festgestellt werden.

3.1.2 Effekte von WNT5A auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen

3.1.2.1 Der Effekt von rmWNT5A auf das Apoptoseverhalten von PaTu-8988t-Gewebekulturzellen

Wie in 3.1.1 beschrieben, führt der „knock-down“ von WNT5A durch siRNA in Pankreaskarzinomzellen zu einer sowohl basal als auch unter TRAIL-Stimulation gesteigerten Apoptoserate. In dem folgenden Versuch sollte daher überprüft werden, ob eine Zugabe von exogenem rmWNT5A (recombinant-murine-WNT5A) den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Reduktion der Apoptoserate, zeigen kann.

Apoptoseinduktion mit Gemcitabine

In diesem Versuch wurde die Apoptose mit Gemcitabine, dem Standardtherapeutikum des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms, eingeleitet. Nach der Zugabe von rmWNT5A (750 ng/ml) wurden die PaTu-8988t-Zellen über 24, 48 und 72 h mit Gemcitabine (80 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde ein Cell Death Detection ELISA durchgeführt.

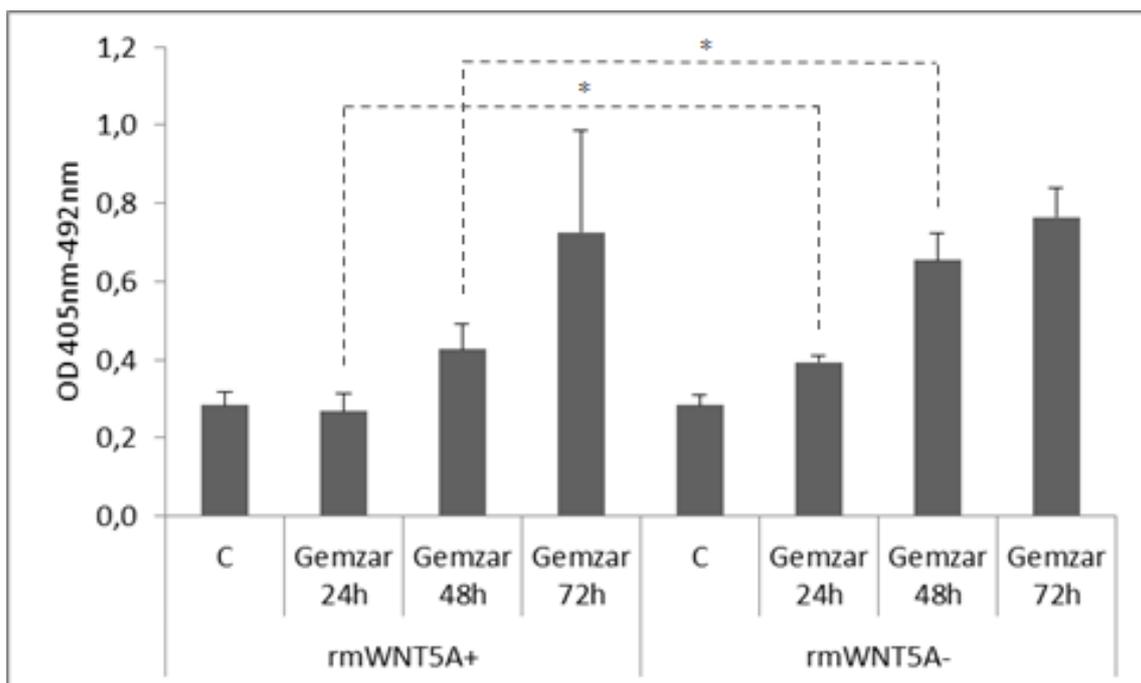


Abb. 3.1.3: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t +/- rmWNT5A, Gemcitabine (Gemzar® 0, 24, 48 und 72h). Angegeben ist der Standardfehler (n=4).

Wie Abb. 3.1.3 zeigt, unterscheiden sich die unbehandelten Kontrollen nicht hinsichtlich der Apoptoserate. D.h. eine Behandlung mit rmWNT5A hat keinen Effekt auf die basale Apoptose.

Nach Apoptoseinduktion mit Gemcitabine über 24 h und 48 h liegt die Apoptoserate der rmWNT5A-behandelten Zellen jedoch deutlich unter der in den nicht behandelten Zellen.

Nach 24 h Exposition gegenüber Gemcitabine liegt die Apoptoserate der rmWNT5A-behandelten Zellen noch auf dem Niveau der Kontrollen, während die der nicht mit rmWNT5A behandelten Zellen bereits deutlich angestiegen ist. Der Unterschied in der Apoptoserate zwischen rmWNT5-behandelten und unbehandelten PaTu-8988t-Zellen nach Kultivierung über 24 h in Gemcitabine-haltigem Medium ist statistisch signifikant ($p=0,044$).

Gleiches gilt für die 48 h Werte. Nicht mit rmWNT5A behandelte Zellen sind deutlich empfänglicher für eine Apoptoseinduktion mit Gemcitabine. Auch dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,036$).

Nach 72 h nähern sich die Apoptoseraten von rmWNT5A-behandelten und unbehandelten Zellen an. Ein Unterschied ist nicht mehr nachweisbar.

Apoptoseinduktion mit TRAIL

PaTu-8988t-Zellen wurden mit rmWNT5A (750 ng/ml) behandelt, bevor mit verschiedenen Konzentrationen von TRAIL (25 und 50 ng/ml) die Apoptose eingeleitet wurde. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Cell Death Detection ELISA.

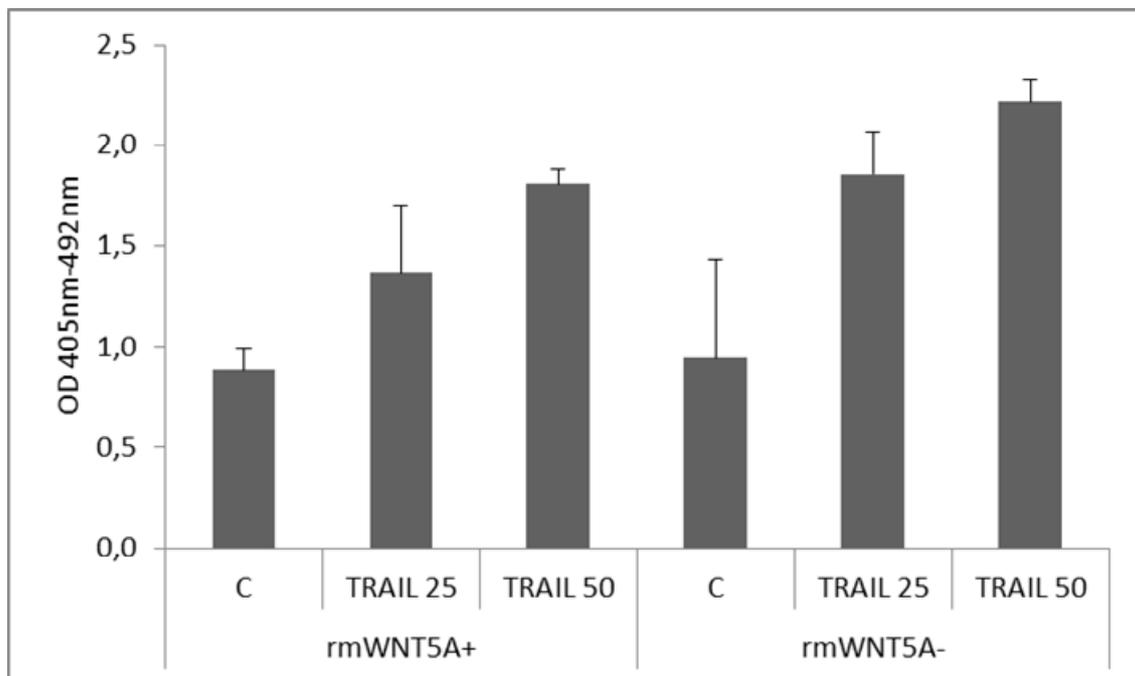


Abb. 3.1.4: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t +/- rmWNT5A, TRAIL (0, 25, 50 ng/ml). Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie in Abb. 3.1.4 zu sehen, hat die Behandlung mit rmWNT5A keine Auswirkung auf die basale Apoptoserate. Allerdings lässt sich eine diskrete Reduktion der Apoptoserate durch Zugabe von rmWNT5A unter TRAIL-Konzentrationen von 25 und 50 ng/ml im Vergleich mit unbehandelten PaTu-8988t-Zellen erkennen.

Dieser Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen, obwohl reproduzierbar, war jedoch im Gegensatz zur Gemcitabine-induzierten Apoptose (Abb. 3.1.3) nicht statistisch signifikant.

3.1.2.2 Untersuchung des Apoptoseverhaltens von stabil WNT5A-überexprimierenden PaTu-8988t pBig2R/WNT5A-Gewebekulturzellen

Die folgenden Versuche hatten zum Ziel, die in 3.1.2.1 vorgestellten Daten zum Apoptoseverhalten von rmWNT5A-behandelten PaTu-8988t-Zellen auf der Grundlage einer stabil WNT5A-überexprimierenden Pankreaskarzinomzelllinie zu ergänzen.

PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A

Die Klonierung des Expressionskonstruktes pBig2R/WNT5A sowie die Erstellung der stabil transfizierten Zelllinien PaTu-8988t pBig2R und PBig2R/WNT5A wird im Teil „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben.

Die Funktionstüchtigkeit wurde mit einem Western-Blot überprüft.

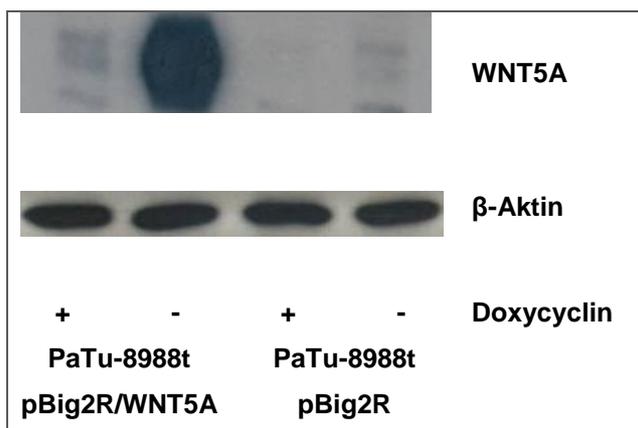


Abb. 3.1.5:

Western Blot auf WNT5A in PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin 2 µg/ml

Abb. 3.1.5 zeigt eine deutliche Überexpression von WNT5A in Abwesenheit von Doxycyclin. Nach Behandlung mit Doxycyclin wird die Überexpression des Konstruktes pBig2R/WNT5A unterdrückt. Die WNT5A-Expression entspricht nun derjenigen der Kontrollklone.

Apoptoseinduktion mit Gemcitabine

Entsprechend der Experimente mit rmWNT5A wurde zunächst der Einfluss einer WNT5A-Überexpression auf die Apoptoseinduktion mit Gemcitabine untersucht.

PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/Wnt5A wurden je mit Doxycyclin (2µg/ml) vorbehandelt oder nicht und über 48 bzw. 72 h mit Gemcitabine inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Cell Death Detection ELISA.

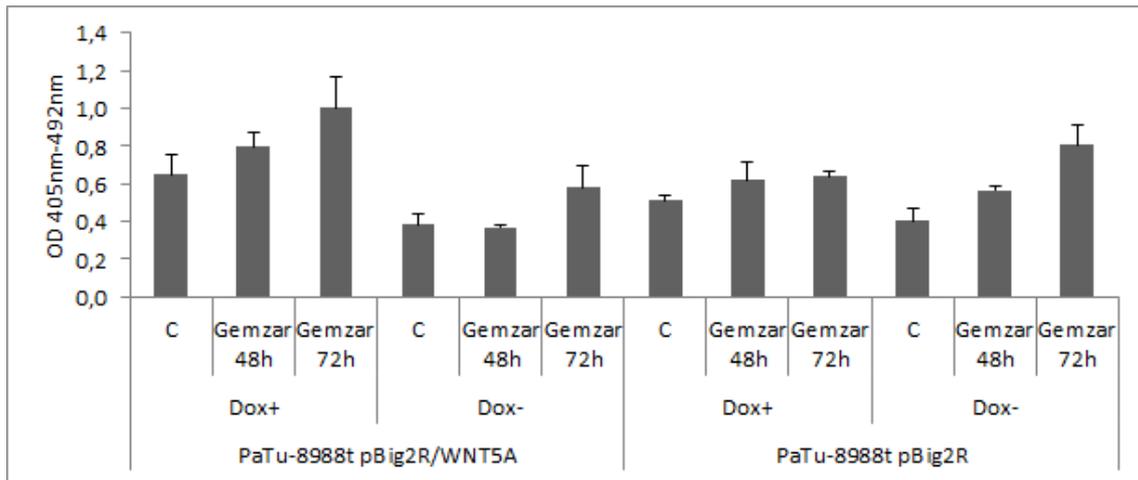


Abb. 3.1.6: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin (2µg/ml), Gemcitabine (Gemzar® 0, 48 und 72h). Angegeben ist der Standardfehler (n=4).

Die Repression des pBig2R/WNT5A-Konstruktes durch Doxycyclin führt zu einer gesteigerten Apoptoserate der PaTu-8988t-Zellen sowohl basal (ohne Gemcitabine) als auch nach Behandlung mit Gemcitabine über 48 und 72 h. Diese Tendenz ist in den Kontrollklonen (PaTu-8988t pBig2R) nicht nachweisbar, womit ein Doxycyclin-Effekt ausgeschlossen ist.

Der deutliche Unterschied hinsichtlich der basalen Apoptoserate macht eine Aussage über den tatsächlichen Einfluss einer WNT5A-Überexpression auf die Gemcitabine-induzierte Apoptose schwierig. Setzt man beide Kontrollen gleich 1 und extrapoliert die jeweiligen Werte für die mit Gemcitabine behandelten Zellen entsprechend, so ist ein möglicher kleiner, allerdings statistisch bei einer großen Standardabweichung nicht signifikanter Unterschied im Sinne einer Resistenzvermittlung gegenüber Gemcitabine-induzierter Apoptose durch WNT5A lediglich nach 48h erkennbar. Die 72h Werte sind nahezu identisch (siehe Abb. 3.1.6.1).

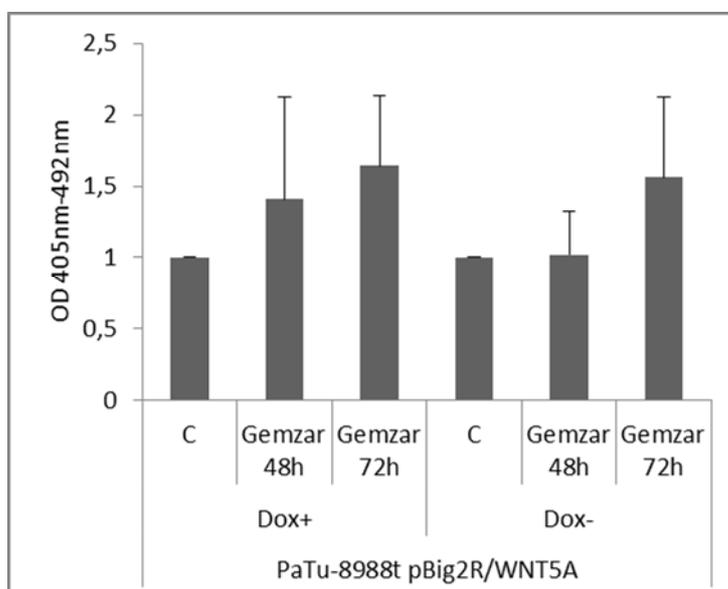


Abb. 3.1.6.1: Modifikation von Abb. 3.1.6. Die Kontrollen des Ansatzes mit PaTu-8988t pBig2R/WNT5A +/-Doxycyclin (2µg/ml) wurden gleich 1 gesetzt und die Werte nach Behandlung mit Gemcitabine (Gemzar® 48 und 72h) wurden entsprechend extrapoliert. Angegeben ist der Standardfehler (n=4).

Apoptoseinduktion mit TRAIL

Die beiden Zelllinien PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A wurden im ersten Schritt je mit Doxycyclin (2 µg/ml) vorbehandelt oder nicht. Anschließend erfolgte die Apoptoseinduktion mit TRAIL (25 und 50 ng/ml). Ausgewertet wurde mittels des Cell Death Detection ELISA.

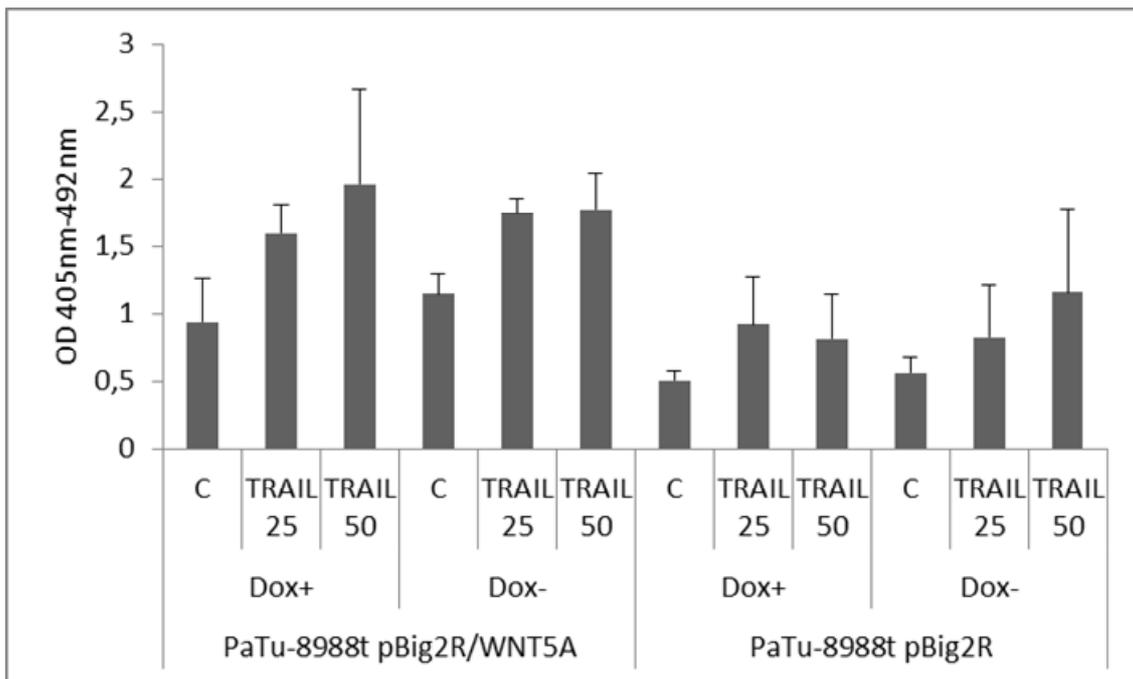


Abb. 3.1.7: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin (2 µg/ml), TRAIL (0, 25 und 50 ng/ml). Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zwischen den mit Doxycyclin behandelten und den unbehandelten PaTu-8988t pBig2R/WNT5A-Zellen besteht kein Unterschied hinsichtlich der TRAIL-induzierten Apoptoserate, und zwar weder bei Konzentrationen von 25 ng/ml noch bei 50 ng/ml. Überraschenderweise ist im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Versuch mit der gleichen Zelllinie (siehe Abb. 3.1.6) kein Effekt der WNT5A-Überexpression auf die basale Apoptoserate zu erkennen.

3.1.3 Effekt von WNT5A auf SAPK/JNK

Wie in der Einleitung dargelegt, ist die intrazelluläre Signalübermittlung von WNT5A Zelltyp-spezifisch und in der Literatur kontrovers diskutiert. Ein oft in der Literatur beschriebener Signalweg verläuft über die Kinase SAPK/JNK.

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob WNT5A in PaTu-8988t im Rahmen des PCP-Signalweges SAPK/JNK aktiviert.

3.1.3.1 Der Effekt von rmWNT5A auf SAPK/JNK

PaTu-8988t-Zellen wurden mit rmWNT5A behandelt und nach einer definierten Zeit (10, 20, 30 und 60 min) geerntet und für den SAPK/JNK-ELISA lysiert. Als Positiv-Kontrolle dienten PaTu-8988t-Zellen die 30 min nach TNF- α Zugabe lysiert wurden. Die unbehandelte Negativkontrolle wurde nach 60 min geerntet.

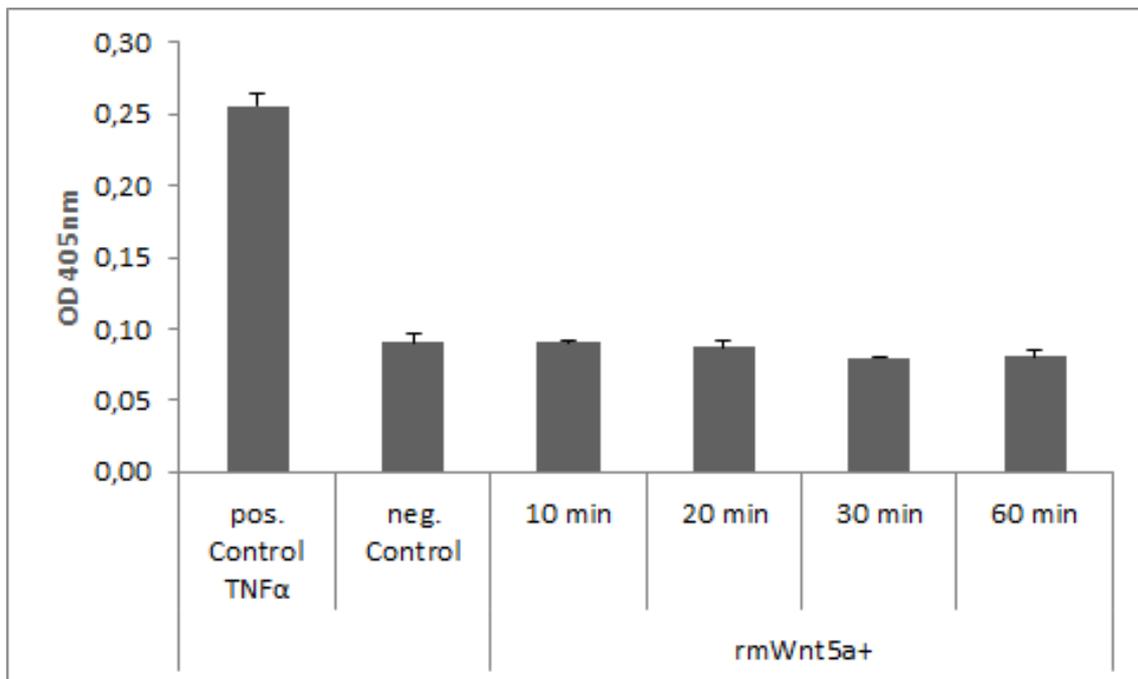


Abb. 3.1.8: SAPK/JNK ELISA PaTu-8988t nach rmWNT5A-Stimulation (10, 20, 30 und 60 min), Positiv-Kontrollen wurden mit TNF- α behandelt. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abb. 3.1.8 zeigt die Positiv-Kontrolle eine deutlich erhöhte SAPK/JNK-Aktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die rmWNT5A-behandelten Zellen bewegen sich auf dem gleichen Niveau wie die Negativ-Kontrolle.

3.1.3.2 Der Effekt einer stabilen WNT5A-Überexpression auf SAPK/JNK

PaTu-8988t pBig2R- und pBig2R/WNT5A-Zellen wurden je mit Doxycyclin behandelt oder nicht und nachgehend auf ihre SAPK/JNK-Aktivität untersucht.

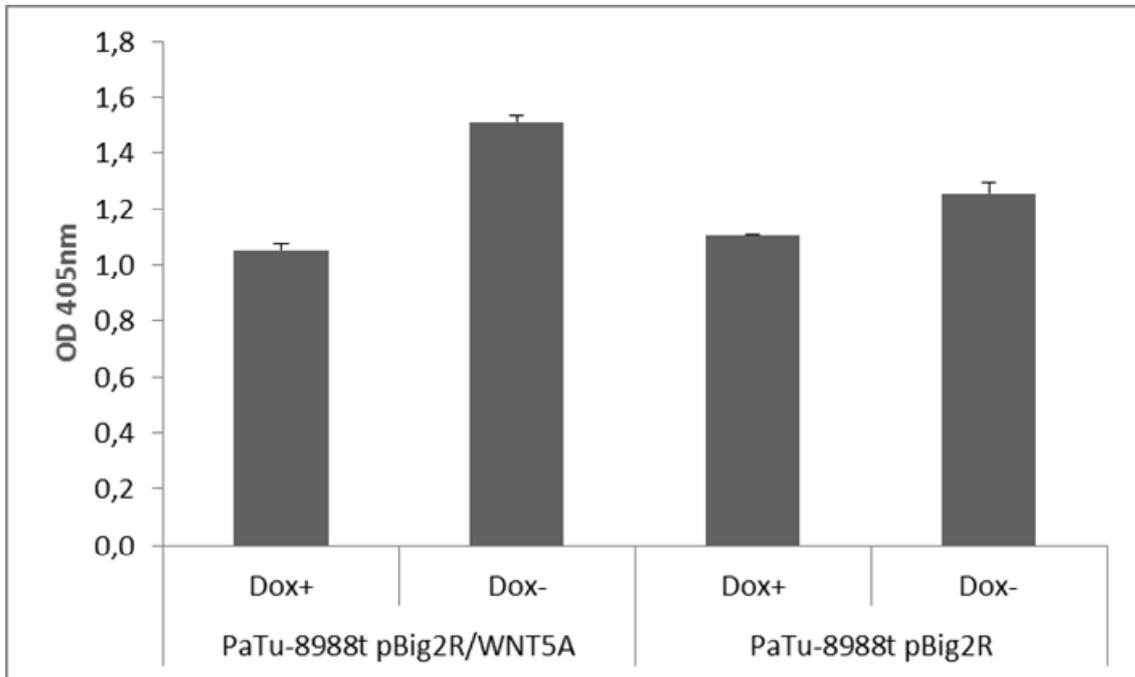


Abb. 3.1.9: SAPK/JNK ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A, +/- Doxycyclin. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abb. 3.1.9 zeigt eine leicht erhöhte SAPK/JNK-Aktivität bei WNT5A-Überexpression (ohne Dox-Zugabe im pBig2R/WNT5A-Konstrukt). Allerdings ist ein gleichsinniger, wenn auch etwas geringerer Effekt, auch in den Kontrollklonen nachweisbar, was im Kontext eines völlig fehlenden Effekts von rmWNT5A (siehe oben, Abb. 3.1.8) einen unspezifischen Effekt von Doxycyclin auf die SAPK/JNK-Aktivität wahrscheinlich macht.

3.2. Ergebnisse: zweiter Teil

3.2.1 Erstellung von NIS-positiven Zelllinien und In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Xenografts im Mausmodell

Um eine In-vivo-Bildgebung von Pankreaskarzinomzellen im Xenograft-Mausmodell mittels ^{99m}Tc -SPECT zu ermöglichen, wurden die beiden Zelllinien PaTu-8988t pBig2R bzw. pBig2R/WNT5A und Imim-Pc1 stabil mit dem Natrium-Iodid-Symporter (NIS) transfiziert.

3.2.1.1 Erstellung von PaTu-8988t pBig2R NIS und pBig2R/WNT5A NIS

Zur Erstellung der beiden stabil transfizierten Zelllinien wurde wie in 2.4.3.3 beschrieben verfahren. Die NIS-Expression wurde über eine qRT-PCR überprüft.

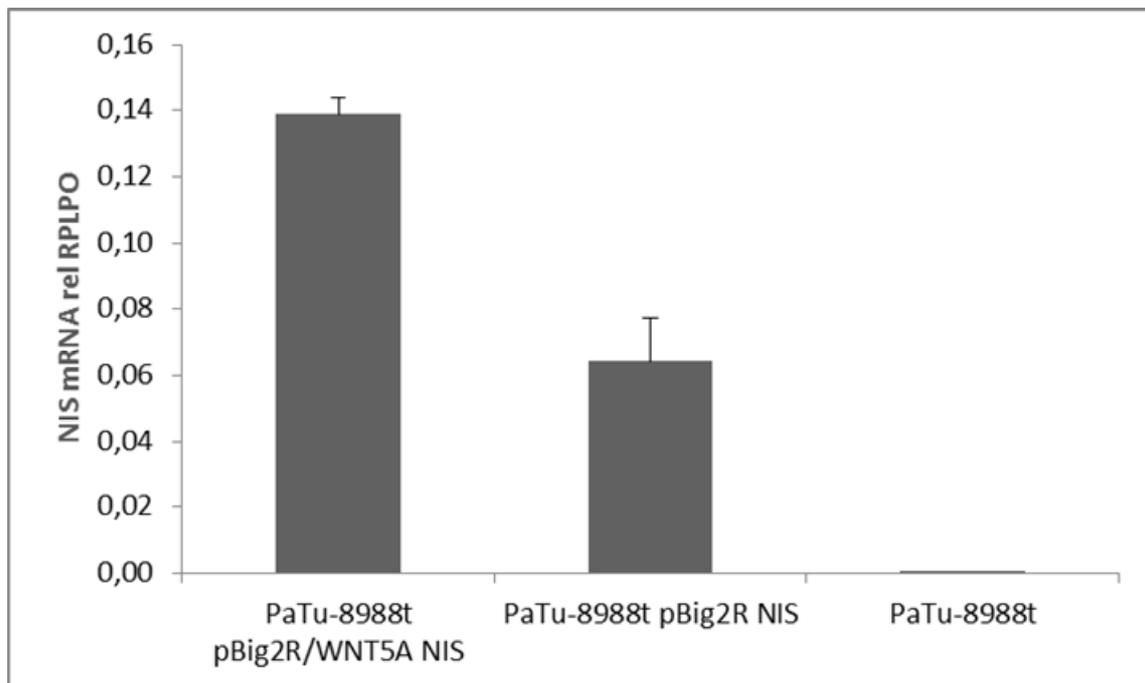


Abb. 3.2.1: qRT-PCR auf NIS-cDNA in PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS bzw. pBig2R NIS und PaTu-8988t. Eine Normalisierung erfolgte auf die Expression von RPLP0. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes.

Analysiert wurde in cDNA umgeschriebene mRNA aus den in Abb. 3.2.1 benannten Zelllinien. Sowohl PaTu-8988t pBig2R NIS als auch pBig2R/WNT5A NIS exprimieren NIS-mRNA, während in nativen PaTu-8988t keine NIS-Expression nachweisbar ist. Eine Überprüfung auf Proteinebene durch Western-Blot Analysen erfolgte nicht, da kein geeigneter Antikörper verfügbar ist.

Die Funktionalität von NIS in den stabil transfizierten Zelllinien wurde allerdings durch einen ^{99m}Tc -Scan an in 6-Well-Gewebekulturplatten ausgesäten PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS- und pBig2R NIS-Zellen sichergestellt.

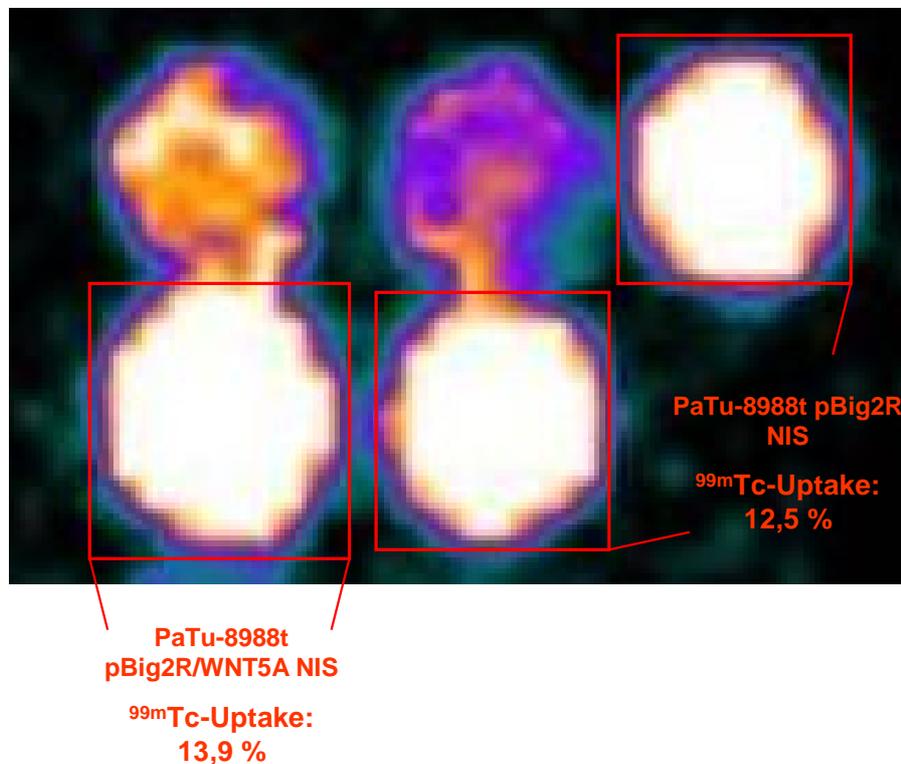


Abb. 3.2.2: ^{99m}Tc -Scan von verschiedenen in 6-Well Gewebekulturplatten ausgesäten PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS- und pBig2R NIS-Kandidaten nach Inkubation mit ^{99m}Tc -haltigem Medium und anschließendem Waschvorgang. Die Aktivität pro Well entspricht dem von den Zellen aufgenommenen ^{99m}Tc . Der prozentuale ^{99m}Tc -Uptake wurde über einen Standard bestimmt. Für genauere Informationen zur Durchführung siehe 2.4.3.4 im Abschnitt „Material und Methoden“. Rot eingerahmt sind die Kandidaten mit suffizienter ^{99m}Tc -Aufnahme.

Abb. 3.2.2 bestätigt die Funktionsfähigkeit des NIS-Proteins in PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS- und pBig2R NIS-Zellen als Vorexperiment zur In-vivo-Bildgebung als Xenograft im Maus-Modell.

Eine tatsächliche In-vivo-Bildgebung konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit wegen unzureichenden Größenwachstums der PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS- und pBig2R NIS-Xenografts nicht durchgeführt werden. Deshalb wurden zusätzlich Experimente mit retroviral NIS-überexprimierenden Imim-Pc1 RV/NIS durchgeführt, wie nachfolgend beschrieben.

3.2.1.2 Erstellung von Imim-Pc 1 RV/NIS

Zur Erstellung von Imim-Pc1 RV/NIS wurde wie in 2.4.3.3 beschrieben verfahren. Die NIS-Expression wurde über eine qRT-PCR überprüft.

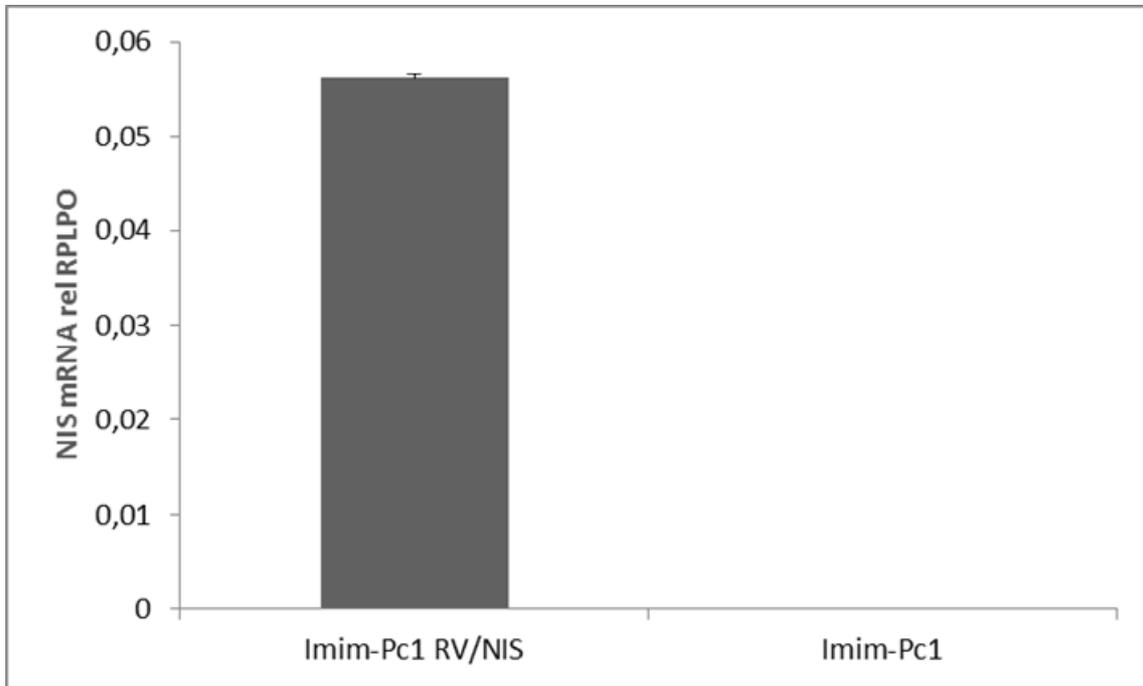


Abb. 3.2.3: qRT-PCR auf NIS-cDNA in Imim-Pc1 RV/NIS und Imim-Pc1. Eine Normalisierung erfolgte auf die Expression von RPLP0. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes.

Analysiert wurde in cDNA umgeschriebene mRNA die aus den in Abb. 3.2.3 genannten Zelllinien isoliert wurde. Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen exprimieren NIS-mRNA, Imim-Pc1-Zellen nicht.

Die Funktionalität des NIS-Proteins in Imim-Pc1 RV/NIS wurde wiederum durch einen ^{99m}Tc -Scan in 6-Well Gewebekulturplatten überprüft.

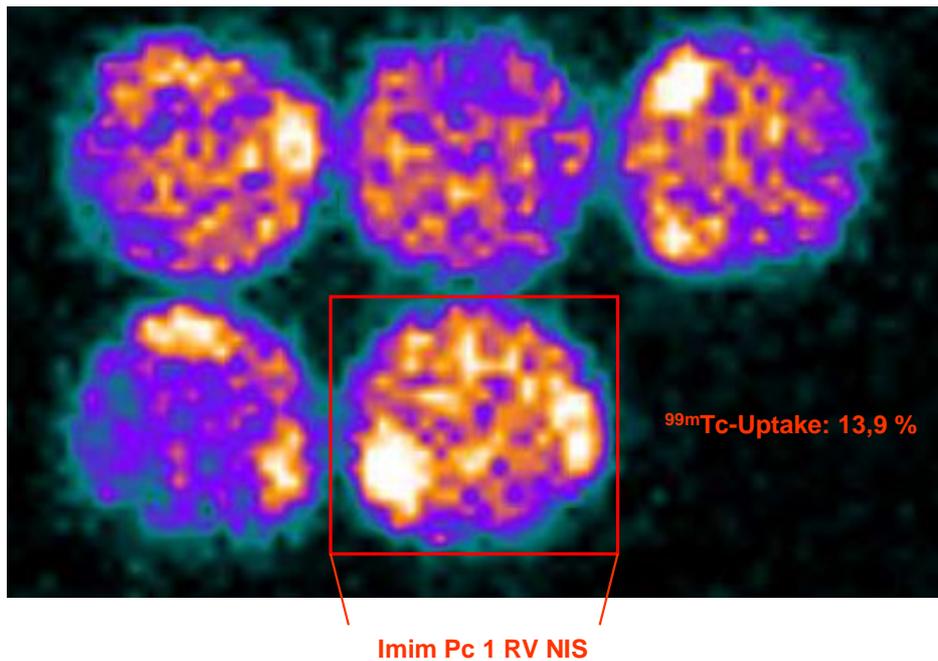


Abb. 3.2.4: ^{99m}Tc -Scan von verschiedenen in 6-Well Gewebekulturplatten ausgesäten Imim-Pc1 RV/NIS-Kandidaten. Rot eingerahmt ist der Kandidat mit der stärksten ^{99m}Tc -Aufnahme. Zur Durchführung siehe Abb. 3.2.2 sowie Punkt 2.4.3.4 im Abschnitt „Material und Methoden“.

Abb. 3.2.4 bestätigt die Funktionsfähigkeit des NIS-Proteins in Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen als Vorexperiment zur In-vivo-Bildgebung als Xenograft im Maus-Modell.

3.2.2 In-vivo-Bildgebung von Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts im Mausmodell

Ziel des Experimentes war es zu zeigen, dass eine In-vivo-Bildgebung von Xenografts aus stabil NIS-überexprimierenden Pankreaskarzinomzellen im Mausmodell möglich ist.

Verwendet wurden die drei Zelllinien PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS und pBig2R NIS sowie Imim-Pc1 RV/NIS. Pro Zelllinie wurden zwei Versuchstiere (Nacktmäuse vom Typ NMRI-Foxn1nu) im Alter von ca. 4-6 Wochen eingesetzt, d.h. die Gesamtzahl belief sich auf sechs Tiere.

Die Injektion der Zellen erfolgte subkutan in die rechte Flanke. Das Tumorwachstum wurde wöchentlich kontrolliert (siehe auch Kapitel 2.6 im Abschnitt „Material und Methoden“).

Da die PaTu-8988t-Zellen ein nur unzureichendes Wachstum zeigten, konnte eine In-vivo-Bildgebung nicht durchgeführt werden. Im Folgenden wurden lediglich die beiden Mäuse mit Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts weiter beobachtet.

Als die Tumore eine Größe von etwa 1 cm^3 erreicht hatten, wurde ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Scan durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.6 im Abschnitt „Material und Methoden“).

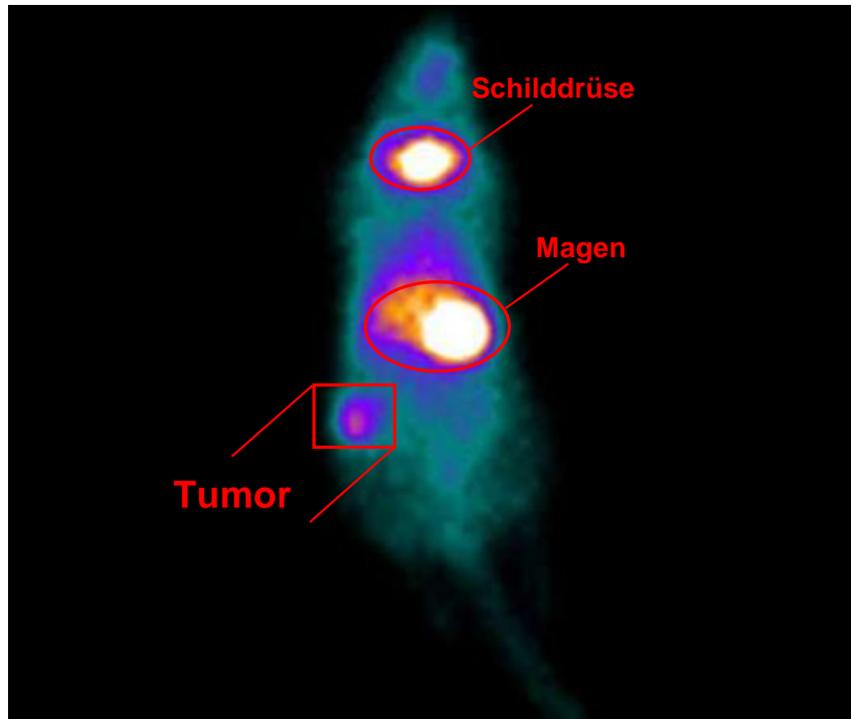


Abb. 3.2.5: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Scan an einem Imim-Pc1 RV/NIS-Xenograft in der Nacktmaus. Ansicht von ventral. Der Tumor hebt sich durch deutliche $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Aufnahme vom umgebenden Gewebe in der rechten Flanke ab. Weitere Organe mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Aufnahme sind die Schilddrüse und der Magen. Medial/kranial des Magens ist $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Aktivität im Blutpool von Herz, Lunge und großen Gefäßen erkennbar.

Abb. 3.2.5 beweist, dass eine In-vivo-Bildgebung von NIS-überexprimierenden Pankreaskarzinomzellen als Xenograft in Nacktmäusen möglich ist.

Nach abgeschlossener Bildgebung wurden die Mäuse geopfert und die Tumoren präpariert. Aus dem Tumorgewebe wurde Gesamt-RNA isoliert. Abb. 3.2.6 zeigt eine qRT-PCR auf NIS aus der in cDNA umgeschriebenen Gesamt-RNA des Tumorgewebes.

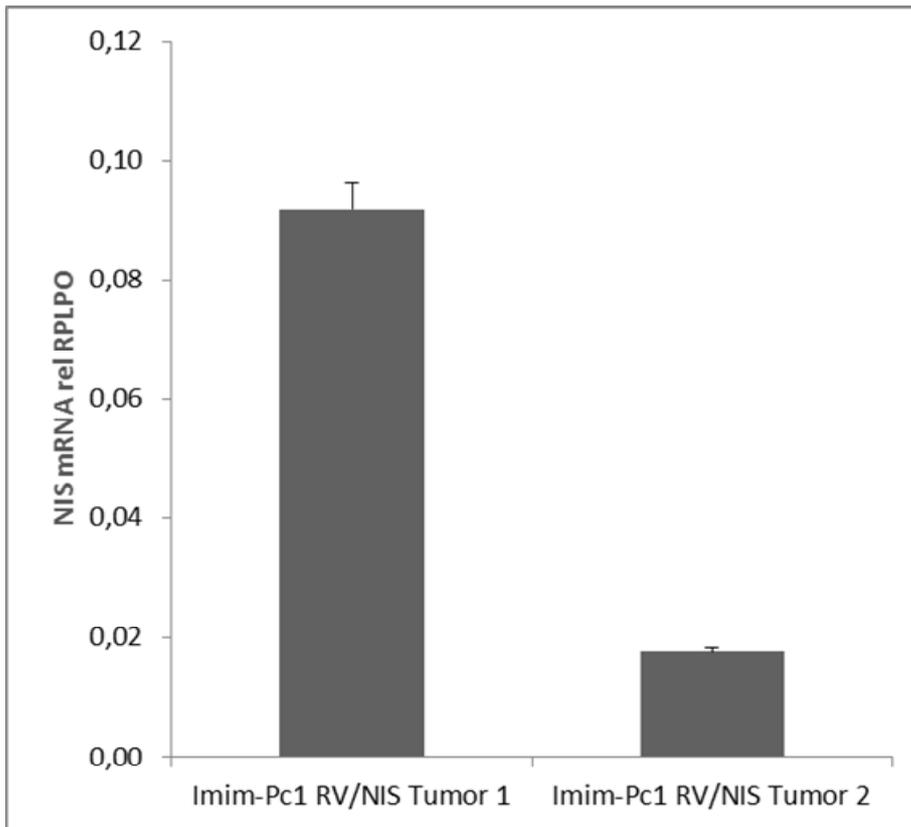


Abb. 3.2.6: qRT-PCR auf NIS-cDNA aus Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts (Tumor 1 und 2). Eine Normalisierung erfolgte auf die Expression von RPLP0. Angegeben ist die Standardabweichung des Mittelwertes.

Abb. 3.2.6 bestätigt die Expression von NIS in Tumor 1 und 2 auf mRNA Ebene. Somit konnte prinzipiell die Eignung von Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen für ein SPECT basiertes Imaging im Xenograft-Mausmodell demonstriert werden.

4. Diskussion

4.1 Diskussion: erster Teil

4.1.1 Die Effekte von WNT5A auf die TRAIL-induzierte Apoptose sind in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten nicht gegensätzlich

WNT5A werden in der Literatur in Bezug auf seinen Beitrag zur Tumorprogression zwei gegensätzliche Rollen zugewiesen. Auf der einen Seite soll es als Tumorsuppressor die Progression verschiedener Tumoren hemmen, auf der anderen Seite als Onkogen wiederum fördern. Diese divergenten Befunde zeigen sich insbesondere in Bezug auf das Migrations- und Invasionsverhalten in den drei untersuchten Zelllinien, wobei WNT5A laut Literaturberichten in SW-480- und MDA-MB-468-Zellen eine tumorsupprimierende, antiinvasive Bedeutung zugeschrieben wird, während eigene Vorarbeiten mit PaTu-8988t-Zellen jedoch tumorfördernde, proinvasive Effekte belegen konnten (Dejmek et al., 2005a; Ripka, 2007; Ripka et al., 2007; Säfholm et al., 2006).

Ob sich diese divergenten Befunde bei verschiedenen Tumorarten auch hinsichtlich verschiedener Effekte von WNT5A auf die TRAIL-induzierte Apoptose bestätigen lassen, war bisher noch unklar, da in eigenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe lediglich für die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu-8988t Daten vorlagen.

Während die Bedeutung von WNT5A für die Apoptosesuszeptibilität von SW480-Zellen weiterhin offen bleibt, konnte aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ein klarer antiapoptotischer Effekt von WNT5A auf die Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 gezeigt werden, welcher der Wirkung von WNT5A auf das Apoptoseverhalten von PaTu-8988t-Zellen entspricht. Bedenkt man, dass der Verlust bzw. die Reduktion der WNT5A-Expression beim Mammakarzinom ein Marker für eine schlechte Prognose ist, war das Ergebnis in dieser Form nicht zu erwarten und widerspricht dem Literaturbericht zu dieser Zelllinie (Dejmek et al., 2005b; Säfholm et al., 2006).

Da im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine Mammakarzinomzelllinie untersucht wurde, kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob WNT5A generell antiapoptotisch im Mammakarzinom wirkt. In Experimenten mit der murinen Brustkrebszelllinie 4T1 hatte das von WNT5A abgeleitete Peptid Foxy-5 zumindest keinen Effekt auf die Apoptoserate (Säfholm et al., 2008). Um diese Frage jedoch abschließend zu klären, müssten Experimente mit deutlich mehr Mammakarzinomzelllinien durchgeführt werden. Dennoch scheint die beschriebene tumorsuppressive Wirkung von WNT5A auf das Mammakarzinom, falls grundsätzlich überhaupt vorhanden, nicht auf proapoptotische Effekte zurückzuführen zu sein.

In dieser Arbeit wurden mit MDA-MB-468 nur RNA-Interferenz-Experimente durchgeführt. Da MDA-MB-468-Zellen im Vergleich mit PaTu-8988t relativ wenig

WNT5A exprimieren (siehe Abb. 3.1.1), müssten Experimente mit rekombinantem WNT5A oder einer stabil WNT5A-überexprimierenden MDA-MB-468-Zelllinie angeschlossen werden (wie bei PaTu-8988t im Rahmen dieser Arbeit geschehen), um wirklich von einer Apoptoseresistenz-vermittelnden Wirkung von WNT5A sprechen zu können, vor allem, da auch die in der Literatur beschriebenen Experimente zu Migration und Invasion mit rekombinantem WNT5A durchgeführt wurden. Allerdings war das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente grundsätzlich divergente Effekte auf die Apoptoserate in unterschiedlichen Zellsystemen zu identifizieren. Da dies mit siRNA-Experimenten nicht gezeigt werden konnte und der Fokus der Arbeit nicht auf dem Mammakarzinom lag, wurden keine weiteren Experimente mit Mammakarzinomzellen durchgeführt.

Die Kolonkarzinomzelllinie SW480 zeigte keinen TRAIL-induzierten Apoptoseanstieg (Abb. 3.1.2). Auch der Anstieg der Apoptoserate nach Applikation von siWNT5A fiel moderat aus, verbunden mit einer ungewöhnlich hohen basalen Apoptoserate. Dadurch sind die Ergebnisse für diese Zelllinie nur begrenzt aussagefähig. Als mögliche Erklärung kann die genetische Instabilität von Tumorzellen angeführt werden. In Tumorzellen kommt es im Laufe jahrelanger Passagen zur Akkumulation unterschiedlichster Mutationen. Diese nehmen mit der Zeit, in der die Zellen in Kultur gehalten werden, ständig zu. Eine Mutation in der TRAIL-Signalkaskade bzw. Apoptosekaskade könnte beispielsweise sowohl für die fehlende induzierbare als auch für die erhöhte basale Apoptose verantwortlich sein. Darüber hinaus unterscheiden sich Tumorzelllinien in ihrem Besitz mit den verschiedenen TRAIL-Rezeptoren. In Hinsicht auf die TRAIL-Resistenz hat hier die Expression der TRAIL-Rezeptoren 3 und 4, sog. Decoy-Rezeptoren, eine besondere Bedeutung, da für sie eine Hemmung der TRAIL-induzierten Apoptose beschrieben ist (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Interessanterweise konnte jüngst für Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass eine Überexpression von Decoy-Rezeptoren mit der Entwicklung einer Resistenz gegen die TRAIL-induzierte Apoptose verbunden ist (Zhou et al., 2013). Für zukünftige Experimente wäre es demnach von entscheidender Bedeutung, Unterschiede in der Expression von TRAIL-Rezeptoren aufzuzeigen, um den Einfluss von WNT5A auf die TRAIL-induzierte Apoptose besser einordnen zu können.

Zusätzlich ist noch anzumerken, dass die in dieser Arbeit untersuchten SW480 stark WNT5A exprimieren. Die SW480-Zellen, für die in der Literatur ein tumorsupprimierender Effekt von WNT5A beschrieben ist, sollen allerdings wenig bis gar kein WNT5A produzieren (Dejmek et al., 2005a). Dieser Unterschied kann ebenfalls durch eine Mutation während der Haltung in Zellkultur bedingt sein und schränkt die Vergleichbarkeit deutlich ein.

Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass kein ausreichender WNT5A-„knock-down“ erzielt werden konnte (Abb. 3.1.1), machen eine Aussage über die tatsächliche Rolle von WNT5A im Apoptoseverhalten von SW480 schwierig.

Es lässt sich jedoch festhalten, dass WNT5A keineswegs gegensätzliche Effekte auf das Apoptoseverhalten von Zellen verschiedener Tumorentitäten hat. Im Gegenteil, in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 wirkt WNT5A ebenso antiapoptotisch wie in Pankreaskarzinomzellen. Und auch der Effekt auf die Kolonkarzinomzelllinie SW480 ist zwar nicht eindeutig, es findet sich aber auch keinerlei Hinweis auf eine proapoptotische Wirkung von WNT5A, wie es im Sinne der Tumorsuppressortheorie zu erwarten wäre.

4.1.2 WNT5A wirkt in PaTu-8988t-Zellen antiapoptotisch und fördert die Chemotherapieresistenz

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits ein antiapoptotischer Effekt von WNT5A auf verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien sowie eine Hemmung der TRAIL-induzierten Apoptose belegt (Ripka, 2007). Diese Ergebnisse basieren allerdings lediglich auf RNA-Interferenz-Experimenten mit siWNT5A. Ob im Gegenzug die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit rekombinantem WNT5A bzw. eine stabile Überexpression von WNT5A die Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli noch weiter verstärkt, blieb bisher offen.

Die eigenen Experimente konnten bestätigen, dass durch die Behandlung von PaTu-8988t-Zellen mit rmWNT5A die Gemcitabine-induzierte Apoptoserate deutlich gesenkt wird. Eine gleichsinnige, wenn auch statistisch nicht signifikante Tendenz konnte in Versuchen mit stabiler WNT5A-Überexpression beobachtet werden. Dies unterstreicht die Bedeutung von WNT5A für die Entwicklung einer Chemotherapie- bzw. Apoptoseresistenz von Pankreaskarzinomzellen.

Allerdings waren die Effekte in den korrespondierenden Experimenten mit TRAIL weitaus geringer ausgeprägt. Während die Behandlung von PaTu-8988t-Zellen mit rmWNT5A tendenziell durchaus zu einer Abschwächung der TRAIL-induzierten Apoptose führt, hat eine stabile Überexpression von WNT5A keinen Effekt auf diese.

Dass für eine Behandlung mit rekombinantem WNT5A bzw. für eine stabile Überexpression von WNT5A keine statistisch signifikante Reduktion der TRAIL-induzierten Apoptose nachgewiesen werden konnte, liegt zum einen mit großer Wahrscheinlichkeit an der Effektgröße:

PaTu-8988t-Zellen exprimieren bereits unter normalen Zellkulturbedingungen bedeutende Mengen an WNT5A (siehe Abb. 3.1.1). Somit ist von vorneherein zu erwarten, dass der Effekt eines WNT5A-„knock-down“ mit siRNA den Effekt einer

weiteren Steigerung der Verfügbarkeit des WNT5A-Liganden (bei ohnehin hoher basaler Produktion) übertreffen muss.

Zum anderen ist TRAIL, z.B. im Vergleich mit Gemcitabine, ein besonders potenter und vor allem ein direkter Apoptoseinduktor. Was die Gefahr birgt, dass durch den starken TRAIL-Stimulus besonders kleinere Effekte zumindest zum Teil überdeckt werden. Dieser Umstand fällt bei Experimenten mit siWNT5A nicht so stark ins Gewicht, da durch den ebenfalls starken Effekt eines kompletten WNT5A-„knock-down“, welcher für sich genommen schon einen Apoptosestimulus darstellt, noch signifikante Ergebnisse erreicht werden können.

Zusammengenommen erklärt dies, warum sowohl in Experimenten mit siWNT5A und TRAIL als auch mit rmWNT5A und Gemcitabine eine antiapoptotische Wirkung von WNT5A statistisch signifikant belegt werden kann, während dieses in der Kombination von rmWNT5A bzw. WNT5A-Überexpression mit TRAIL nicht gelingt.

Neben diesen Anmerkungen bedarf eine weitere Beobachtung aus den Experimenten zum Einfluss von WNT5A auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen der Diskussion.

Wie Abb. 3.1.6 zeigt, steigert die Repression des pBig2R/WNT5A-Konstruktes mit Doxycyclin die basale Apoptoserate, ganz ähnlich einem „knock-down“ mit siWNT5A (siehe Abb. 3.1.2). Interessanterweise konnte ein vergleichbarer Effekt auf die basale Apoptoserate weder in den Experimenten mit rmWNT5A noch in dem Versuch zur TRAIL-induzierten Apoptose mit PaTu-8988t pBig2R/WNT5A beobachtet werden. Zumindest für den fehlenden Einfluss von rmWNT5A auf die basale Apoptoserate gibt es eine naheliegende Erklärung. Wie bereits weiter oben erwähnt, sollte der Effekt von zusätzlichem WNT5A-Protein auf PaTu-8988t-Zellen, die bereits unter normalen Bedingungen WNT5A produzieren, zumindest in Abwesenheit von Stressoren gering sein. In den Versuchen mit PaTu-8988t pBig2R/WNT5A geht man allerdings von vollkommen anderen Grundvoraussetzungen aus. Da es sich bei pBig2R/WNT5A um ein reprimierbares Konstrukt handelt, werden die Zellen in Kultur ständig mit einer massiven WNT5A-Produktion konfrontiert. In solch einem unphysiologischen Milieu kommt es zwangsläufig zu Adaptationsvorgängen. Wird das pBig2R/WNT5A Konstrukt nun durch Doxycyclin reprimiert, so entspricht dies in adaptierten Zellen einem WNT5A-„knock-down“, aus welchem eine gesteigerte basale Apoptoserate resultieren kann.

Hiermit ist jedoch weiter unklar, warum die Repression von pBig2R/WNT5A in den Experimenten mit Gemcitabine (siehe Abb. 3.1.6) einen Einfluss auf die basale Apoptoserate hat und in den Experimenten mit TRAIL (siehe Abb. 3.1.7) nicht. Die Erklärung hierfür könnte in der unterschiedlich langen Versuchsdauer begründet sein, aufgrund derer die Kontrollen im Versuch mit Gemcitabine 48 h länger mit Doxycyclin

behandelt bzw. nicht behandelt wurden. Somit könnte in den Experimenten mit TRAIL die Inkubationszeit zu kurz gewesen sein, um den Effekt auf die basale Apoptoserate zu betonen.

Ein weiterer Diskussionspunkt betrifft eine Diskrepanz in der Steigerung der Apoptoserate unbehandelter PaTu-8988t-Zellen nach Apoptoseinduktion mit TRAIL in verschiedenen Experimenten.

Gemäß Abb. 3.1.2 führt die Behandlung der lediglich mit siC transfizierten PaTu-8988t-Zellen mit TRAIL zu einer Steigerung der Apoptoserate um etwa den Faktor 10. In den folgenden Experimenten mit TRAIL (siehe Abb. 3.1.4 und 3.1.7) wurde jedoch lediglich eine Steigerung der basalen Apoptoserate um den Faktor 2-2,5 erreicht.

Ein offensichtlicher Erklärungsansatz bezieht sich auf Unterschiede in den jeweils verwendeten Konzentrationen von TRAIL. Während für die Versuche mit siWNT5A eine Konzentration von 75 ng/ml gewählt wurde, wurde diese in den darauffolgenden Versuchen mit rmWNT5A und stabiler WNT5A-Überexpression auf 25 bzw. 50 ng/ml reduziert. Auf diese Weise wurde die TRAIL-Wirkung bewusst abgeschwächt, um, wie bereits weiter oben beschrieben, den erwartungsgemäß geringeren Effekt einer Zugabe von rmWNT5A bzw. stabiler WNT5A-Überexpression gegenüber einem „knock-down“ mittels siWNT5A nicht durch die starke Apoptoseinduktion durch TRAIL zu überdecken.

Ein zweiter Erklärungsansatz bezieht sich auf Unterschiede bezüglich der basalen Apoptoserate in den verschiedenen Experimenten.

In Abb. 3.1.2 ist die deutliche Steigerung der Apoptoserate von PaTu-8988t-Zellen der Kontrollgruppe nach Zugabe von TRAIL vor allem durch den niedrigen Ausgangswert (OD 405-492nm: 0,063) bedingt. Eine derart niedrige basale Apoptoserate wurde in den nachfolgenden Experimenten mit PaTu-8988t-Zellen und TRAIL (Abb. 3.1.4 und 3.1.7) nicht mehr erreicht. Die Ursache hierfür ist im unterschiedlichen Experiment-Design zu suchen. In den Versuchen von Abschnitt 3.1.1 erfolgte die Aussaat und Transfektion primär im 6-Well-Format. Lediglich zur Behandlung mit TRAIL und Durchführung des Cell Death Detection ELISA wurden die Zellen für 24 h ins 96-Well-Format überführt. In den Versuchen zu Abb. 3.1.4 und 3.1.7 wurden die Zellen initial im 96-Well-Format ausgesät und über die komplette Versuchsdauer von 96 h in diesem inkubiert.

4.1.3 WNT5A hat keinen Einfluss auf die Regulation von SAPK/JNK in PaTu-8988t-Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, ist das WNT5A-Signalnetzwerk äußerst komplex. Von Zellsystem zu Zellsystem werden verschiedene Signalwege aktiviert. In Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass WNT5A die

kanonische Signalkaskade aktiviert und ein Einfluss auf den Ca^{2+} -abhängigen Signalweg konnte weitgehend ausgeschlossen werden (Ripka, 2007; Ripka et al., 2007). Ob WNT5A den PCP-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen aktiviert, war bislang unklar. In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass SAPK/JNK als Effektor von WNT5A in PaTu-8988t-Zellen keine Rolle spielt.

Diese Entdeckung ist interessant und zwar besonders in Hinblick auf das antiapoptotische Potential von WNT5A. In Experimenten mit verschiedenen Karzinomzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung von SAPK/JNK Tumorzellen für die Chemotherapie-induzierte Apoptose sensitivieren kann (Ohtsuka et al., 2003; Sah et al., 2003). Dass eben diese Facette des WNT5A-Signalnetzwerks im Pankreaskarzinom keine Rolle zu spielen scheint, liefert einen weiteren Ansatz, um zu erklären, warum WNT5A hier die Tumorprogression fördert.

Auf der anderen Seite ist eine Hemmung der Chemotherapie-induzierten Apoptose durch den kanonischen Signalweg, welcher in Pankreaskarzinomzellen durch WNT5A aktiviert wird, gut belegt (Chen et al., 2001).

Bedenkt man, dass WNT5A gerade als typischer Vertreter der nicht-transformierenden WNT-Proteine unter physiologischen Bedingungen besonders mit den nicht-kanonischen Signalwegen in Verbindung gebracht wird, so scheint die Konstellation, wie wir sie im Pankreaskarzinom vorfinden, eher ungewöhnlich. Allerdings könnte gerade in dieser Konstellation die Ursache dafür liegen, dass WNT5A im Pankreaskarzinom (u.a. Tumorentitäten) zur Tumorprogression beiträgt, während es in anderen Tumoren und physiologischen Geweben gerade den entgegengesetzten, nämlich einen tumorsuppressiven, Effekt hat.

Einschränkend muss gesagt werden, dass in dieser Arbeit lediglich PaTu-8988t-Zellen untersucht wurden. Um die Beobachtungen zu erhärten, müssten weitere Experimente mit mehreren Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt werden.

Welcher Signalweg in Gegenwart von WNT5A aktiviert wird, hängt ganz wesentlich vom Rezeptorenbesatz der jeweiligen Zelllinie ab (van Amerongen et al., 2008). Diese Feststellung wirft, das Pankreaskarzinom betreffend, zwei Fragen auf. Erstens: welche Rezeptoren vermitteln das WNT5A-Signal im Pankreaskarzinom? Und zweitens: in wie weit unterscheidet sich das WNT5A-Rezeptorenprofil von Pankreaskarzinomzellen von dem anderer Tumorentitäten? Bedenkt man, dass WNT5A in der Zwischenzeit neben den klassischen Fz- und LRP-Rezeptoren mit einer ganzen Reihe weiterer Rezeptoren in Verbindung gebracht wird (Kikuchi et al., 2012), könnten entsprechende Untersuchungen unser Bild vom WNT5A-Signalnetzwerk in Tumoren wesentlich verbessern. Vor allem durch welchen Mechanismus WNT5A die kanonische Signalkaskade im Pankreaskarzinom aktiviert und ob hier neben den Fz-Rezeptoren noch andere Rezeptoren eine Rolle spielen, ist bisher nicht geklärt.

Dass das kanonische WNT5A-Signal in Pankreaskarzinomzellen überhaupt zur Geltung kommt, könnte zum Teil in der fehlenden Aktivierung nicht-kanonischer Signalwege durch WNT5A und damit durch den Wegfall ihres funktionellen Antagonismus begründet sein (siehe Kapitel 1.1.4). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu erfahren, inwieweit eine Aktivierung der nicht-kanonischen bzw. eine Hemmung der kanonischen Signalkaskade die tumorfördernden Effekte von WNT5A aufheben könnte. Nicht zuletzt könnten auf diesem Weg neue Angriffspunkte für die Antitumortherapie im Allgemeinen und für das Pankreaskarzinom im Speziellen identifiziert werden.

Abschließend soll noch darauf hingewiesen werden, dass die drei in dieser Arbeit näher erläuterten Signalwege bei weitem nicht das gesamte Spektrum des WNT5A-Signalnetzwerks beschreiben können. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bisher unbekannte Signalwege mit den Ergebnissen dieser Arbeit interferieren. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass die kanonische Signalkaskade, obwohl ein wesentlicher Faktor, in der Zukunft um weitere im Pankreaskarzinom aktive WNT5A-Signalwege ergänzt werden wird.

4.1.4 Fazit: erster Teil

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurden zum einen bereits publizierte Daten der Arbeitsgruppe wesentlich ergänzt. So wurde die Bedeutung von WNT5A als Vermittler von Apoptoseresistenz im Pankreaskarzinom bekräftigt. Darüber hinaus konnte durch die Einbeziehung des Chemotherapeutikums Gemcitabine ein Bezug zur klinischen Behandlung des Pankreaskarzinoms hergestellt werden. Die Bedeutung der kanonischen Signalkaskade für die Vermittlung von WNT5A-Effekten im Pankreaskarzinom konnte durch den Ausschluss einer SAPK/JNK-Aktivierung weiter herausgestellt werden.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass WNT5A zumindest auf MDA-MB-468-Zellen dieselbe antiapoptotische Wirkung hat wie auf Pankreaskarzinomzelllinien. Damit konnten in diesem Fall in Bezug auf die Vermittlung von Apoptoseresistenz gegensätzliche Effekte von WNT5A in verschiedenen Tumorentitäten ausgeschlossen werden.

4.2 Diskussion: zweiter Teil

4.2.1 In-vivo-Bildgebung von Pankreaskarzinom-Xenografts im Mausmodell

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten drei NIS-positive Zelllinien erstellt werden. Von diesen Zelllinien konnte mit den Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts erfolgreich eine Bildgebung mittels SPECT durchgeführt werden. Leider musste bei den übrigen beiden Zelllinien wegen ungenügenden Tumorwachstums auf eine Bildgebung verzichtet

werden. Im Unterschied zu Imim-Pc1 RV/NIS waren die beiden PaTu-8988t-Zelllinien allerdings nicht nur NIS-positiv, sondern auch mit dem durch Doxycyclin reprimierbaren Vektor pBig2R bzw. pBig2R/WNT5A stabil transfiziert. Der nächste Schritt für die Zukunft muss es sein NIS-positive Xenografts zu erstellen, in denen die Expression eines Kandidatengens, wie etwa WNT5A, durch die Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser der Mäuse reguliert werden kann. Hierbei gilt es dann zu evaluieren, ob Unterschiede im Größenwachstum durch die NIS-Bildgebung detektiert werden können. Bei subkutanen Xenografts kann als Standard die konventionelle Vermessung mittels einer Schieblehre herangezogen werden. Erst wenn sichergestellt ist, dass mit diesem Verfahren die Tumore mit ausreichender Genauigkeit dargestellt werden können, können Experimente mit orthotopen Xenografts durchgeführt werden.

Die In-vivo-Bildgebung orthotoper, sprich direkt in der Pankreasloge lokalisierter, Xenografts ist der eigentliche Grund, weswegen diese Methode in der Arbeitsgruppe etabliert werden soll. Vor diesem Hintergrund ergeben sich aber aufgrund der Erfahrungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnen wurden, erhebliche Probleme. Betrachtet man die Abb. 3.2.5, so lässt sich das Xenograft in der rechten Flanke deutlich abgrenzen. Allerdings zeigen sowohl die Schilddrüse als auch der Magen eine erhebliche ^{99m}Tc -Pertechnetat-Aufnahme. Auch der thorakale Blutpool gibt ein Signal. Während die Aufnahme in die Schilddrüse in dieser Intensität erwartet war und für unsere Versuche weitgehend unerheblich ist, stellt der Magen das eigentliche Problem dar. Dessen ^{99m}Tc -uptake fiel deutlich stärker aus als erwartet. Durch die direkte räumliche Nähe des Magens zur Pankreasloge könnte dieser erheblich mit dem Signal eines orthotopen Xenografts interferieren.

Die Lösung des Problems könnte eine Ko-Registrierung von SPECT- und MRT-Signal sein (Schipper et al., 2007). Auf diesem Weg könnte die notwendige Auflösung erzeugt werden, um den Tumor vom Magen abzugrenzen. Zudem könnte durch die Kombination der Informationen der SPECT-Aufnahme und der morphologisch/anatomischen Informationen aus dem MRT eine dreidimensionale Darstellung erzielt werden, aus der direkt das Tumolvolumen berechnet werden kann. Ein weiteres Problem besteht in der exakten Identifizierung von pulmonalen Metastasen. Hier spielt nicht nur eine Überlagerung durch den Magen sondern auch durch den thorakalen Blutpool eine Rolle. Pulmonale Metastasen würden so bis zu einer bestimmten Größe verschleiert. Allerdings sollte auch hier die Kombination mit einem MRT eine wesentlich sensitivere Darstellung ermöglichen.

4.2.2 Fazit: zweiter Teil

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Pankreaskarzinom-Xenografts im Mausmodell prinzipiell möglich ist. Für

weitere Experimente mit orthotopen Xenografts bzw. für pulmonale Metastasierungsmodelle scheint eine Kombination mit der MRT nicht nur sinnvoll sondern notwendig.

5. Zusammenfassung

Die WNT-Familie umfasst mindestens 19 evolutionär hoch-konservierte, sezernierte, cysteinreiche Glykoproteine. WNT-Proteine werden abhängig von ihrer Fähigkeit Zellen zu transformieren in zwei Gruppen eingeteilt.

WNT5A gehört zu den am besten untersuchten Vertretern der nicht-transformierenden WNT-Proteine. Als solches wird es klassischerweise mit den sog. nicht-kanonischen Signalwegen in Verbindung gebracht.

In der Literatur finden sich divergierende Angaben zur Rolle von WNT5A bei der Progression maligner Tumore verschiedener Entitäten. So gilt WNT5A z.B. im Mamma- und Kolonkarzinom als Tumorsuppressor und Marker für eine günstige Prognose. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass WNT5A die Progression des Pankreaskarzinoms fördert, und zwar über antiapoptotische, pro-migratorische und pro-invasive Effekte. Dabei aktivierte WNT5A überraschenderweise die kanonische Signalkaskade und nicht die nicht-kanonischen Signalwege. Ob WNT5A in Pankreaskarzinomzellen einen Einfluss auf den PCP-Signalweg bzw. auf SAPK/JNK hat, blieb bislang offen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotische Wirkung von WNT5A nicht auf Pankreaskarzinomzellen begrenzt ist. Zumindest in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 führte die Behandlung mit siWNT5A sowohl zu einer Erhöhung der basalen Apoptoserate als auch der TRAIL-induzierten Apoptose. Zudem konnte die antiapoptotische Wirkung von WNT5A auf Pankreaskarzinomzellen in Experimenten mit rekombinantem WNT5 bestätigt werden. Durch rekombinantes WNT5A konnte die Apoptoserate nach Behandlung der Zellen mit Gemcitabine, dem Standardtherapeutikum des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms, signifikant gesenkt werden. Darüber hinaus konnte eine Aktivierung von SAPK/JNK durch WNT5A in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu-8988t ausgeschlossen werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass WNT5A seine Effekte auf das Pankreaskarzinom über die kanonische Signalkaskade vermittelt.

Um die Eignung eines Kandidatengens wie WNT5A für neue therapeutische Strategien zu evaluieren reichen reine in vitro-Analysen nicht aus. Eine Strategie Targetgene in vivo zu untersuchen besteht darin, menschliche Tumorzellen, die stabil oder induzierbar das jeweilige Gen exprimieren, als Xenografts in athymische Nacktmäuse zu implantieren. Eine kontinuierliche Erfassung der Größenzunahme ist allerdings nur bei subkutanen Xenografts einfach durchführbar. Eine Darstellung von orthotopen Pankreaskarzinom-Xenografts in vivo ist mit herkömmlichen Techniken der Bildgebung bislang nicht möglich.

Ein neuer Ansatz besteht darin, Tumorzellen stabil mit dem Natrium-Jodid-Symporter (NIS) zu transfizieren. Durch Schwanzvenen-Injektion von ^{99m}Tc -Pertechnetat können dann die Xenografts in vivo mittels Szintigraphie/SPECT dargestellt werden.

Dazu wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit drei Pankreaskarzinomzelllinien stabil mit NIS transfiziert: Imim-Pc1 RV/NIS, PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS und PaTu-8988t-pBig2R NIS. Mit allen drei Zelllinien wurden subkutane Xenografts in Nacktmäusen erstellt. Allerdings zeigten nur die Imim-Pc1-Xenografts ausreichendes Größenwachstum, um eine erfolgreiche ^{99m}Tc -SPECT-Bildgebung durchzuführen.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine In-vivo-Bildgebung mittels ^{99m}Tc -SPECT von NIS-positiven Pankreaskarzinom-Xenografts möglich ist. Damit ist der Grundstein für das langfristige Ziel einer In-vivo-Bildgebung von orthotopen Pankreaskarzinom-Xenografts zur In-vivo-Targetgenevaluation gelegt.

6. Abstract

WNT ligands constitute a family of at least 19 highly conserved, secreted, cysteine-rich glycoproteins. They have been divided into two different groups based on their ability to induce transformation of cells.

WNT5A is one of the best investigated members of the non-transforming WNT protein-group and is therefore associated with the so called non-canonical signaling pathways. However, the precise role of WNT5A in tumorigenesis remains ambiguous. For example in colorectal cancer and ductal breast cancer WNT5A is considered to be a tumor suppressor and its loss is an independent factor predicting poor prognosis. In contrast WNT5A has been identified as a potent enhancer of malignant progression in pancreatic cancer. Previous data of this group has demonstrated antiapoptotic, pro-migratory and pro-invasive effects of WNT5A on pancreatic tumor cells. In this context WNT5A surprisingly activated the canonical cascade, while failing to signal via the WNT/Ca²⁺ pathway.

This dissertation was able to demonstrate that the antiapoptotic effects of WNT5A are not restricted to pancreatic cancer cells. At least in MDA-MB-468 breast cancer cells a knock-down of WNT5A led to an increase in basal and TRAIL-induced apoptosis. In addition, the antiapoptotic effects of WNT5A in pancreatic cancer could be confirmed in experiments with recombinant WNT5A. Treatment with rmWNT5A reduced the rate of gemcitabine-induced apoptotic cell death significantly. At the same time WNT5A had no impact on SAPK/JNK in PaTu-8988t cells, underlining the importance of the canonical cascade for WNT5A signaling in pancreatic cancer.

In vitro experiments are not sufficient to evaluate the use of WNT5A and other genes for new therapeutical applications. A well established strategy for in vivo evaluation is the generation of xenografts in athymic nude mice by implanting human tumor cells that are stably or conditionally transfected with the gene of interest.

A methodical challenge of xenograft experiments is that only the growth of subcutaneous xenografts can be easily measured. In case of pancreatic cancer in vivo imaging of orthotopic xenografts is difficult.

The establishment of sodium/iodide symporter (NIS) expressing xenografts from pancreatic tumor cells is a completely new approach, because NIS expressing tumor cells can be visualised via SPECT following i.v. injection of ^{99m}Tc pertechnetate.

In this dissertation three pancreatic cancer cell lines have been stably transfected with NIS Imim-Pc1 RV/NIS, PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS and PaTu-8988t pBig2R NIS. Subsequently a small group of athymic nude mice has been subcutaneously injected, each with one of the three cell lines to establish xenografts. Unfortunately, only

xenografts from Imim-Pc1 cells showed sufficient growth to perform a ^{99m}Tc pertechnetate SPECT scan.

This dissertation demonstrates that in vivo imaging of NIS expressing pancreatic cancer cell xenografts is feasible, therefore providing a basis for further experiments with orthotopic xenografts.

Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Blanc, E., Roux, G.L., Bénard, J., and Raguénez, G. (2005). Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24, 1277-1283.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2, 241-243.

Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-1521.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033-1038.

Burriss, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., *et al.* (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15, 2403-2413.

Carmichael, J., Fink, U., Russell, R.C., Spittle, M.F., Harris, A.L., Spiessi, G., and Blatter, J. (1996). Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73, 101-105.

Casper, E.S., Green, M.R., Kelsen, D.P., Heelan, R.T., Brown, T.D., Flombaum, C.D., Trochanowski, B., and Tarassoff, P.G. (1994). Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 12, 29-34.

Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11, S37-43.

Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M.W., Kitajewski, J., and Wang, C.Y. (2001). Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 152, 87-96.

Chen, T., Yang, I., Irby, R., Shain, K.H., Wang, H.G., Quackenbush, J., Coppola, D., Cheng, J.Q., and Yeatman, T.J. (2003). Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res* 63, 4368-4374.

Ciruna, B., Jenny, A., Lee, D., Mlodzik, M., and Schier, A.F. (2006). Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature* 439, 220-224.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149, 1192-1205.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.

Da Forno, P.D., Pringle, J.H., Hutchinson, P., Osborn, J., Huang, Q., Potter, L., Hancox, R.A., Fletcher, A., and Saldanha, G.S. (2008). WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 14, 5825-5832.

Dai, G., Levy, O., and Carrasco, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379, 458-460.

De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43, 745-756.

Dejmek, J., Dejmek, A., Säfholm, A., S  lander, A., and Andersson, T. (2005a). Wnt-5a protein expression in primary duodenal B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res* 65, 9142-9146.

Dejmek, J., Leandersson, K., Manjer, J., Bjartell, A., Emdin, S.O., Vogel, W.F., Landberg, G., and Andersson, T. (2005b). Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 11, 520-528.

Dissanayake, S.K., Wade, M., Johnson, C.E., O'Connell, M.P., Leotlela, P.D., French, A.D., Shah, K.V., Hewitt, K.J., Rosenthal, D.T., Indig, F.E., *et al.* (2007). The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition

of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 17259-17271.

Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G., and Gress, T.M. (2001). Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61, 4222-4228.

Enomoto, M., Hayakawa, S., Itsukushima, S., Ren, D.Y., Matsuo, M., Tamada, K., Oneyama, C., Okada, M., Takumi, T., Nishita, M., *et al.* (2009). Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene* 28, 3197-3208.

Fernandez-del Castillo, C., and Jimenez, R.E. (2012). Epidemiology and risk factors for exocrine pancreatic cancer (www.uptodate.com).

Fiedler, M., Mendoza-Topaz, C., Rutherford, T.J., Mieszczanek, J., and Bienz, M. (2011). Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1937-1942.

Goonasinghe, A., Mundy, E.S., Smith, M., Khosravi-Far, R., Martinou, J.C., and Esposti, M.D. (2005). Pro-apoptotic Bid induces membrane perturbation by inserting selected lysolipids into the bilayer. *Biochem J* 387, 109-118.

Green, J.L., Kuntz, S.G., and Sternberg, P.W. (2008). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* 18, 536-544.

Gress, T.M., Müller-Pillasch, F., Geng, M., Zimmerhackl, F., Zehetner, G., Friess, H., Büchler, M., Adler, G., and Lehrach, H. (1996). A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* 13, 1819-1830.

Habas, R., and Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol* 4, 2.

Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107, 843-854.

Hayakawa, J., Mittal, S., Wang, Y., Korkmaz, K.S., Adamson, E., English, C., Ohmichi, M., Omichi, M., McClelland, M., and Mercola, D. (2004). Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* 16, 521-535.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., and Varmus, H. (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275, 1652-1654.

He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677.

Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Heufelder, A.E., Morgenthaler, N., Schipper, M.L., and Joba, W. (2001). Sodium iodide symporter-based strategies for diagnosis and treatment of thyroidal and nonthyroidal malignancies. *Thyroid* 11, 839-847.

Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.

Homsy, J.G., Jasper, H., Peralta, X.G., Wu, H., Kiehart, D.P., and Bohmann, D. (2006). JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Dyn* 235, 427-434.

Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Klöppel, G., Longnecker, D.S., *et al.* (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25, 579-586.

Hruban, R.H., van Mansfeld, A.D., Offerhaus, G.J., van Weering, D.H., Allison, D.C., Goodman, S.N., Kensler, T.W., Bose, K.K., Cameron, J.L., and Bos, J.L. (1993). K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82

carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143, 545-554.

Huang, C.L., Liu, D., Nakano, J., Ishikawa, S., Kontani, K., Yokomise, H., and Ueno, M. (2005). Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23, 8765-8773.

Huang, M., Wang, Y., Sun, D., Zhu, H., Yin, Y., Zhang, W., Yang, S., Quan, L., Bai, J., Wang, S., *et al.* (2006). Identification of genes regulated by Wnt/beta-catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis. *BMC Cancer* 6, 221.

Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., and Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51, 6110-6117.

Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 23, 131-139.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.

Jones, C., and Chen, P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* 29, 120-132.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801-1806.

Jönsson, M., Dejmek, J., Bendahl, P.O., and Andersson, T. (2002). Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 62, 409-416.

Karin, M., and Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 57, 283-295.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 17-33.

Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F.C., Ulrich, F., Tada, M., and Heisenberg, C.P. (2003). The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev* 120, 467-476.

Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482-7491.

Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., and Markham, A. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366-1370.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588.

Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68-75.

Koornstra, J.J., de Jong, S., Hollema, H., de Vries, E.G., and Kleibeuker, J.H. (2003). Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 45, 37-53.

Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schöfl, C., Andersson, T., and Brabant, G. (2005). Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24, 2144-2154.

Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W., and Kikuchi, A. (2006). Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 66, 10439-10448.

Kyriakis, J.M., Woodgett, J.R., and Avruch, J. (1995). The stress-activated protein kinases. A novel ERK subfamily responsive to cellular stress and inflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 766, 303-319.

Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-12711.

Lee, J.M., Kim, I.S., Kim, H., Lee, J.S., Kim, K., Yim, H.Y., Jeong, J., Kim, J.H., Kim, J.Y., Lee, H., *et al.* (2010). RORalpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer. *Mol Cell* 37, 183-195.

Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A.M., McMahon, A., Sussman, D.J., and Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 129-134.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Li, V.S., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., *et al.* (2012). Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149, 1245-1256.

Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349-360.

Liu, J., Stevens, J., Rote, C.A., Yost, H.J., Hu, Y., Neufeld, K.L., White, R.L., and Matsunami, N. (2001). Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 7, 927-936.

Liu, X.H., Pan, M.H., Lu, Z.F., Wu, B., Rao, Q., Zhou, Z.Y., and Zhou, X.J. (2008). Expression of Wnt-5a and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 40, 560-567.

Llense, F., and Martín-Blanco, E. (2008). JNK signaling controls border cell cluster integrity and collective cell migration. *Curr Biol* 18, 538-544.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.

Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., and Baltimore, D. (2004a). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119, 97-108.

Lu, X., Borchers, A.G., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J.C., and Tessier-Lavigne, M. (2004b). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430, 93-98.

Maksimovic-Ivanic, D., Stosic-Grujicic, S., Nicoletti, F., and Mijatovic, S. (2012). Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunol Res* 52, 157-168.

Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., *et al.* (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809.

Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 12, 876-884.

Mason, J.O., Kitajewski, J., and Varmus, H.E. (1992). Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol Biol Cell* 3, 521-533.

Matsumoto, S., Fumoto, K., Okamoto, T., Kaibuchi, K., and Kikuchi, A. (2010). Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *EMBO J* 29, 1192-1204.

Michl, P., and Downward, J. (2006). CUTL1: a key mediator of TGFbeta-induced tumor invasion. *Cell Cycle* 5, 132-134.

Michl, P., Ramjaun, A.R., Pardo, O.E., Warne, P.H., Wagner, M., Poulsom, R., D'Arrigo, C., Ryder, K., Menke, A., Gress, T., *et al.* (2005). CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7, 521-532.

Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol* 3, REVIEWS3001.

Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., and Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 17 Suppl 5, v7-12.

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., *et al.* (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared

with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960-1966.

Nepveu, A. (2001). Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270, 1-15.

Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L., and Müller, U. (2004). Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74, 558-563.

Nishita, M., Itsukushima, S., Nomachi, A., Endo, M., Wang, Z., Inaba, D., Qiao, S., Takada, S., Kikuchi, A., and Minami, Y. (2010). Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* 30, 3610-3619.

Nishita, M., Yoo, S.K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., and Minami, Y. (2006). Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 175, 555-562.

Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., and Minami, Y. (2008). Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem* 283, 27973-27981.

Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., and Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64, 231.

Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.

Nusse, R., and Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell* 69, 1073-1087.

Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

O'Connell, M.P., Fiori, J.L., Baugher, K.M., Indig, F.E., French, A.D., Camilli, T.C., Frank, B.P., Earley, R., Hoek, K.S., Hasskamp, J.H., *et al.* (2009). Wnt5A activates the calpain-mediated cleavage of filamin A. *J Invest Dermatol* 129, 1782-1789.

Ohtsuka, T., Buchsbaum, D., Oliver, P., Makhija, S., Kimberly, R., and Zhou, T. (2003). Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene* 22, 2034-2044.

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., *et al.* (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8, 645-654.

Oving, I.M., and Clevers, H.C. (2002). Molecular causes of colon cancer. *Eur J Clin Invest* 32, 448-457.

Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., Kruyt, F., and de Jong, S. (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1805, 123-140.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.

Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K.P., Dai, X., and Chen, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 306, 121-133.

Redston, M.S., Caldas, C., Seymour, A.B., Hruban, R.H., da Costa, L., Yeo, C.J., and Kern, S.E. (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54, 3025-3033.

Reichsman, F., Smith, L., and Cumberledge, S. (1996). Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 135, 819-827.

Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.

Ries, L. (2000). SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996, M. Eisner, ed. (Bethesda, MD: National Cancer Institute).

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649-657.

Ripka, S. (2007). Funktionelle Analyse des Glykoproteins WNT5A als Zielgen des Transkriptionsfaktors CUTL1 im Pankreaskarzinom, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.). In Zentrum für Innere Medizin Klinik für Innere Medizin I (Ulm: Universität Ulm), pp. 110.

Ripka, S., König, A., Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B., Klöppel, G., Downward, J., Gress, T., and Michl, P. (2007). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178-1187.

Roberts, A.B., and Wakefield, L.M. (2003). The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8621-8623.

Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Cordeu, L., Vilas-Zornoza, A., San Jose-Eneriz, E., Garate, L., Castillejo, J.A., Martin, V., Prosper, F., Heiniger, A., *et al.* (2007). WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 43, 2736-2746.

Ross, D.D., and Cuddy, D.P. (1994). Molecular effects of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) on DNA replication in intact HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 48, 1619-1630.

Sah, N.K., Munshi, A., Kurland, J.F., McDonnell, T.J., Su, B., and Meyn, R.E. (2003). Translation inhibitors sensitize prostate cancer cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 278, 20593-20602.

Sasai, N., Nakazawa, Y., Haraguchi, T., and Sasai, Y. (2004). The neurotrophin-receptor-related protein NRH1 is essential for convergent extension movements. *Nat Cell Biol* 6, 741-748.

Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. (2010). Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J* 29, 41-54.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.

Schambony, A., and Wedlich, D. (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* 12, 779-792.

Schipper, M.L., Riese, C.G., Seitz, S., Weber, A., Béhé, M., Schurrat, T., Schramm, N., Keil, B., Alfke, H., and Behr, T.M. (2007). Efficacy of ^{99m}Tc pertechnetate and ¹³¹I radioisotope therapy in sodium/iodide symporter (NIS)-expressing neuroendocrine tumors in vivo. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34, 638-650.

Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., *et al.* (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57, 3126-3130.

Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P.J., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* 14, 484-492.

Shaib, Y.H., Davila, J.A., and El-Serag, H.B. (2006). The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 87-94.

Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (1999). Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9, 695-698.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.

Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M., and Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354, 494-496.

Säfholm, A., Leandersson, K., Dejmek, J., Nielsen, C.K., Villoutreix, B.O., and Andersson, T. (2006). A formylated hexapeptide ligand mimics the ability of Wnt-5a to impair migration of human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 281, 2740-2749.

Säfholm, A., Tuomela, J., Rosenkvist, J., Dejmek, J., Härkönen, P., and Andersson, T. (2008). The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxy-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. *Clin Cancer Res* 14, 6556-6563.

Takada, R., Hijikata, H., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells* 10, 919-928.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13, 149-156.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899-908.

Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 133, 1123-1137.

Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset, C., Penzo-Méndez, A., Riou, J.F., Boucaut, J.C., and Shi, D.L. (2000). The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J* 19, 4944-4954.

van Amerongen, R., Mikels, A., and Nusse, R. (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 1, re9.

van Loo, G., Saelens, X., van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031-1042.

Vlad, A., Röhrs, S., Klein-Hitpass, L., and Müller, O. (2008). The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* 20, 795-802.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.

Wallingford, J.B., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2, 695-706.

Wang, H., Lee, Y., and Malbon, C.C. (2004). PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem Soc Trans* 32, 792-796.

Wang, Q., Williamson, M., Bott, S., Brookman-Amisshah, N., Freeman, A., Nariculam, J., Hubank, M.J., Ahmed, A., and Masters, J.R. (2007). Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26, 6560-6565.

Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., and Trent, J.M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.

Wilentz, R.E., Goggins, M., Redston, M., Marcus, V.A., Adsay, N.V., Sohn, T.A., Kadkol, S.S., Yeo, C.J., Choti, M., Zahurak, M., *et al.* (2000). Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol* 156, 1641-1651.

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., and Smith, C.A. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.

Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., and Luo, L. (2001). Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81-91.

Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88.

Wong, G.T., Gavin, B.J., and McMahon, A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278-6286.

Wong, H.C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.L., and Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12, 1251-1260.

Wright, T.M., Brannon, A.R., Gordan, J.D., Mikels, A.J., Mitchell, C., Chen, S., Espinosa, I., van de Rijn, M., Pruthi, R., Wallen, E., *et al.* (2009). Ror2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma. *Oncogene* 28, 2513-2523.

Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Matsubara, A., Yasui, W., and Kikuchi, A. (2010). Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29, 2036-2046.

Yang, G.Y., Liang, B., Zhu, J., and Luo, Z.G. (2011). Calpain activation by Wingless-type murine mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) promotes axonal growth. *J Biol Chem* 286, 6566-6576.

Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 228-237.

Zhou, J., Song, S., He, S., Wang, Z., Zhang, B., Li, D., and Zhu, D. (2013). Silencing of decoy receptor 3 (DcR3) expression by siRNA in pancreatic carcinoma cells induces Fas ligand-mediated apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* 32, 653-660.

Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

- Abb. 1.1.1: Die kanonische Signalkaskade auf der Ebene des Zerstörungskomplexes
- Abb. 1.1.2: Der WNT/PCP-Signalweg
- Abb. 1.1.3: Der WNT/Ca²⁺-Signalweg
- Abb. 3.1.1: Western Blot PaTu-8988t, SW-480 und MDA-MB-468 auf WNT5A nach Behandlung mit siRNA gegen WNT5A (siWNT5A) bzw. nicht-wirksamer Kontroll siRNA (siC)
- Abb. 3.1.2: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t, SW-480 und MDA-MB-468 siWNT5A/siC, +/- TRAIL (75 ng/ml)
- Abb. 3.1.3: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t +/- rmWNT5A, Gemcitabine (Gemzar® 0, 24, 48 und 72h)
- Abb. 3.1.4: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t +/- rmWNT5A, TRAIL (0, 25, 50 ng/ml)
- Abb. 3.1.5: Western Blot auf WNT5A in PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin 2 µg/ml
- Abb. 3.1.6: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin (2µg/ml), Gemcitabine (Gemzar® 0, 48 und 72h)
- Abb. 3.1.6.1: Modifikation von Abb. 3.1.6, Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin (2µg/ml), Gemcitabine (Gemzar® 0, 48 und 72h), Kontrollen = 1
- Abb. 3.1.7: Cell Death Detection ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A +/- Doxycyclin (2 µg/ml), TRAIL (0, 25 und 50 ng/ml)
- Abb. 3.1.8: SAPK/JNK ELISA PaTu-8988t nach rmWNT5A-Stimulation (10, 20, 30 und 60 min), positiv Kontrollen wurden mit TNF-α behandelt
- Abb. 3.1.9: SAPK/JNK ELISA PaTu-8988t pBig2R und pBig2R/WNT5A, +/- Doxycyclin
- Abb. 3.2.1: qRT-PCR auf NIS-cDNA in PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS bzw. pBig2R NIS und PaTu-8988t
- Abb. 3.2.2: 99mTc-Scan von in 6-Well Gewebekulturplatten ausgesäten PaTu-8988t pBig2R/WNT5A NIS und pBig2R NIS nach Inkubation mit 99mTc haltigem Medium und anschließendem Waschvorgang
- Abb. 3.2.3: qRT-PCR auf NIS-cDNA in Imim-Pc1 RV/NIS und Imim-Pc1
- Abb. 3.2.4: 99mTc-Scan von in 6-Well Gewebekulturplatten ausgesäten Imim-Pc1 RV/NIS-Zellen
- Abb. 3.2.5: 99mTc-Scan an einem Imim-Pc1 RV/NIS-Xenograft in der Nacktmaus

Abb. 3.2.6: qRT-PCR auf NIS-cDNA aus Imim-Pc1 RV/NIS-Xenografts (Tumor 1 und 2)

Tabellen

Tab. 2.1.1: Expressionskonstrukte

Tab. 2.1.2: verwendete siRNA

Tab. 2.1.3: PCR-Primer

Tab. 2.1.4: Primer für qRT-PCR

Tab. 2.1.5: primäre Antikörper

Tab. 2.1.6: sekundäre Antikörper

Tab. 2.1.7: rekombinantes Protein

Tab. 2.1.8: Bakterienstämme

Tab. 2.1.9: Zelllinien

Tab. 2.1.10: Mausstämme

Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruracil
7TM	Seven-transmembrane
^{99m} Tc	^{99m} Technetium-Per technetat
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Adenomatous polyposis coli Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinases
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-directed proteases
CDD-ELISA	Cell Death Detection ELISA ^{plus®}
cDNA	Complementary DNA
CIP	Calf-intestinal alkaline phosphatase
CK1	Creatin-Kinase 1
CREB	cAMP response element-binding protein
Daam1	Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1
DAG	Diacylglycerol
DEP-Domäne	Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin Domäne
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonukleotid
Dsh	Dishevelled
dsRNA	Double-stranded RNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FCS	Fetal Calf Serum
Fz	Frizzled
G	Guanosin
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
Int 1	integration 1
IP3	Inositol Triphosphat
KCl	Kalium-Chlorid
Kpn1	Klebsiella pneumoniae Restriktionsendonuklease 1
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
MAP-Kinase	Mitogen-activated Kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	MutS homolog 2
NaCl	Natrium-Chlorid
NaF	Natrium-Fluorid
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NRH1	Neurotrophin receptor homolog 1
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	Pancreatic intraepithelial lesion
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Planar cell polarity
PCR	polymerase chain reaction
PDZ-Domäne	PSD95-Dlg1-zo1 Domäne
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PTK7	Tyrosine-protein kinase-like 7
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROI	region of interest
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0
RT	Reverse Transkriptase
Ryk	Receptor-like tyrosine kinase
SAPK/JNK	Stress-activated phospho-kinase/c-Jun n-terminale Kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siah2	seven in absentia homolog 2
siRNA	Small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SMAD4	SMA (small body size)-MAD (mothers against decapentaplegic) 4
Spe1	Sphaerotilus Restriktionsendonuklease 1
SPECT	Single-photon emission computed tomography
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS-Tween
TCF/LEF	T-cell-specific transcription factor/lympoid enhancer- binding factor
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tet	Tetracyclin
TGF- β	Transforming growth-factor β
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TP53	Tumor protein 53
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	Ultraviolett
Wg	Wingless
WNT	Wg-int

WTX

Wilms Tumor Protein

Lebenslauf**Zur Person**

Moritz Pralle

Geb. am 28.06.1985 in Gelnhausen

Ledig

Schulbildung

08/91-07/95

Grundschule Woltersdorf

08/95-07/97

Orientierungsstufe Lüchow

08/97-07/04

Gymnasium Lüchow

25.06.2004

Abitur, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

09/04-05/05

Biosphärenreservat Niedersächsische Elbtalaue

Studium

08/05-05/12

Studium der Medizin an der Philipps Universität
Marburg

22.05.2012

zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Doktorarbeit

Seit 04/08

Doktorarbeit in der Klinik für Gastroenterologie und
Stoffwechsel am Uniklinikum Marburg**Beruf**

seit 12/12

Assistenzarzt am Klinikum Bremerhaven-
Reinkenheide Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik I

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg

Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Becker, Berger, Bien, Buchholz, Dahm-Daphi, Daut, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grosse, Grzeschik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kircher, Klose, Koolman, Kruse, Lill, Lohoff, Luers, Maier, Maisch, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Ripka, Röhm, Röoer, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Sekundo, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zovko,

in Siegen

Gehrke, Grond, Hering, Palm, Schanz,

in Kassel

Gillissen, Gradaus, Neuzner, Plum, Schuppert, Wolf

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Th. M. Gress danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in der Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Patrick Michl für die Vergabe dieses spannenden Themas, für die in jeglicher Hinsicht gewährte Unterstützung, für das großartige Engagement, mit dem er mich über die ganze Zeit hinweg begleitet hat, und für den unerschütterlichen Optimismus, der mich nach so manchem Rückschlag wieder aufgebaut hat. Vielen Dank!

Mein größter Dank geht an Dr. Stefanie Ripka. Ohne ihre geduldige Anleitung, ihre fachliche Kompetenz und ihr offenes Ohr wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Und noch wichtiger, ohne sie hätte ich in all den Jahren im Labor nur halb soviel Spaß gehabt. Danke, dass Du eine gute Freundin geworden bist!

Dr. Heidi Griesmann danke ich für die tolle Betreuung und Unterstützung während der Mausversuche im Rahmen des NIS-Projektes, und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes und die vielen guten Ratschläge, die daraus resultierten.

Desweiteren möchte ich mich bei Benjamin, Eva, Jan, Juliane und Silke für den regen Gedankenaustausch, die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit, die wir zusammen verbracht haben, bedanken. Wegen euch bin ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen.

Das gleiche gilt für die Mitarbeiter der AG Ellenrieder und der AG Buchholz, die ganz wesentlich zur guten Stimmung im Labor beigetragen haben.

Dr. Andreas Pfestroff und Herrn Damiano Librizzi danke ich für die Durchführung der ^{99m}Tc -Scans und für die insgesamt sehr freundliche Zusammenarbeit.

Inbesondere möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Schwester Lena, meinen Großeltern und meinen Eltern bedanken, die mich stets auf meinem Lebensweg vorbehaltlos unterstützt haben. Vielen Dank, dass ich mich immer auf Euch verlassen konnte!

Zuletzt danke ich der Person, die mein Leben erst zu etwas Besonderem macht: meiner Freundin Meike. Vielen Dank, dass Du immer für mich da bist.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss des Glykoproteins WNT5A auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen und In-vivo-Bildgebung von NIS-positiven Pankreaskarzinom-Xenografts in Nacktmäusen“ in der Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Prof. Dr. med. Th. M. Gress mit Unterstützung durch PD Dr. P. Michl ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Bestandteile dieser Doktorarbeit wurden unter dem Titel „WNT5A - NFAT Signaling Mediates Resistance to Apoptosis in Pancreatic Cancer“ (Griesmann et al. (2013). Neoplasia 15, 11-22) im Journal „Neoplasia“ veröffentlicht.

Marburg,

Moritz Pralle