Universitätsklinikum Ulm Zentrum für Innere Medizin Klinik für Innere Medizin I Leiter Prof. Dr. G. Adler

Funktionelle Analyse des Glykoproteins WNT5A als Zielgen des Transkriptionsfaktors CUTL1 im Pankreaskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> vorgelegt von Stefanie Ripka aus Günzburg

> > Ulm 2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1.Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Gress
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Dürre
Tag der Promotion:	15. Juni 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkür	zungsverzeichnis	III
1. Ei	nleituna	1
1.1	Die Familie der WNT-Proteine	1
1.2	WNT-Signalwege	2
1.3	Modulatoren der Tumorprogression am Pankreaskarzinom	8
1.4	Die Apoptose-Signalkaskade und dessen Regulation durch WN	IT-
	Proteine	11
1.5	Die Rolle von WNT5A bei der Tumorprogression	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2. Ma	terial und Methoden	16
2.11	Material	16
2.2	Vethoden	25
3. Erę	gebnisse	47
3.1	Regulation von WNT5A durch den Transkriptionsfaktor CUTL1	47
3.2	CUTL1 vermittelt seine Effekte auf Migration und Invasion über	
	WNT5A	50
3.3	WNT5A wird durch TGFß über CUTL1 reguliert, ist ein Bestand	lteil
	der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und beeinfluss	t den
	ß-Catenin-abhängigen Signalweg	56
3.4	WNT5A ist während der Karzinogenese im Pankreas und im	
	Pankreaskarzinom stark exprimiert	63
3.5	CUTL1 und WNT5A als antiapoptotisch wirkende Faktoren in	
	Pankreaskarzinom-Zelllinien	65
4. Di	skussion	75
4.1	Die WNT5A Expression im Pankreaskarzinom und seinen	
	Vorläuferläsionen	76
4.2	Der Transkriptionsfaktor CUTL1 vermittelt seine Effekte auf	
	Migration und Invasion über WNT5A	77

I

4	.3	WNT5A aktiviert die kanonische Signalkaskade in			
		Pankreaskarzinomzellen	78		
4	4.4 CUTL1 und WNT5A als Bestandteil der TGFß-vermittelten				
		Tumorprogression	79		
4	4.5 WNT5A reguliert die Expression von EMT-Markerproteinen 80				
4	4.6 Die Rolle von CUTL1 und WNT5A in der TRAIL-induzierten				
	Apoptose 81				
4	.5	Schlussfolgerung	82		
5.	Zus	sammenfassung	83		
6.	6. Literaturverzeichnis				

П

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name		
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule		
APC	Adenomatous Polyposis Coli Protein		
APS	Ammoniumpersulfat		
AS	Aminosäure		
ATCC	American Type Culture Collection		
ATP	Adenosintriphosphat		
bp	Basenpaare		
BSA	Bovines Serum Albumin		
CamKII	Calmodulin Kinase II		
CDP	CCAAT-Displacement Protein		
CIP	Calf Intestine Polymerase		
CK1	Casein Kinase 1		
COX2	Cycloocxgenase 2		
CRD	cysteinreiche Domäne		
CtBP	C-terminal Binding Protein		
DAG	Diacylglycerol		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNase	Desoxyribonuklease		
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphate		
Dsh	Dishevelled Protein		
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen		
dsRNA	doppelsträngige RNA		
DTT	Dithio-Threitol		
E.coli	Escherichia coli		
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures		
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat		
EGF	Epidermal Growth Factor		

EMT	epidermal-mesenchymale Transition		
FACS	Fluorescence activated cell sorting		
FADD	Fas-associated Death Domain Protein		
FCS	Fetal calf serum		
Frat 1	Frequently rearranged in T-Cell Lymphoma 1		
FRP	Frizzled-related Protein		
Fzd	Frizzled-Rezeptor		
GSK3ß	Glykogen Synthase Kinase 3 beta		
HDAC1	Histon Deacetylase 1		
HGF	Hepatocyten-Wachstumsfaktor		
HMG	High Mobility Group		
HRP	Hourse Radish Peroxidase		
IGF	Insulin-like Growth Factor		
IP3	Inositoltrisphosphat		
JNK	Jun N-terminale Kinase		
kb	Kilo-Base		
kDa	Kilo-Dalton		
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium		
LEF	Lymphoid Enhancer Factor		
LRP	LDL-Rezeptor-related Protein		
MMP7	Matrix Metalloproteinase 7		
mRNA	messanger RNA		
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T-Cells		
NSCLC	Non-small-cell lung cancer		
OD	optische Dichte		
oNPG	o-Nitrophenyl-ß-D-Galactosid		
OPG	Osteoprotegrin		
ORF	Open Reading Frame		
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia		
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase		
PCP	WNT/planar cell polarity signaling pathway		
PCR	Polymerase Chain Reaction		

PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma		
PIP2	Phosphoidylinositol 4,5-Bisphosphat		
РКС	Protein Kinase C		
PP2A	Protein Phosphatase 2 A		
PTN	Pleiotrophin		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RGS	Regulator of G-Protein Signaling		
RISC	RNA-induced silencing complex		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA Interference		
rpm	rounds per minute		
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR		
SDS	Sodium-Dodecyl-sulfat		
siRNA	small interfering RNA		
TCF	T-Cell Factor		
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
TGFα	transforming growth factor alpha		
TGFß	transforming growth factor beta		
TIEG	TGFß-inducible early gene		
TLE	Transducin-like Enhancer of split		
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Rezeptor 1		
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand		
ß-TrCP	beta-Transducin repeat Containing Protein		
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling		
U	Unit		
Wif-1	WNT Inhibitory Factor 1		

1. Einleitung

1.1 Die Familie der WNT-Proteine

Die WNT-Gene kodieren eine große Familie sezernierter Proteine, welche in Invertebraten und Vertebraten, aber nicht in Pflanzen und Prokaryoten vorkommen. Es wurden bereits 19 humane WNT-Proteine identifiziert [The Wnt gene homepage "http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html."], die in ca. 35% ihrer Aminosäuresequenz identisch sind. Die einzelnen WNT-Proteine können nochmals in Untergruppen eingeteilt werde. In diesen Untergruppen, wie z.B. WNT3 und WNT3A, kann es durchaus zu einer Sequenzübereinstimmung von 58-83% kommen [Miller, 2002].

Die WNT-Proteine stellen Cystein-reiche, sezernierte Glykoproteine dar. Sie besitzen 23-24 Cysteinreste, die vermutlich durch Ausbildung von Disulfidbrücken zur Faltung der Proteine beitragen [Miller, 2002]. An einem dieser Cysteinreste sind die WNT-Proteine palmitoyliert. Diese Modifikation ist wichtig für die Aktivität der Proteine [Willert et al. 2003]. Die sezernierten Proteine assoziieren zum Teil mit der extrazellulären Matrix und sind fest an die Zelloberfläche gebunden [Bradley and Brown 1990]. Eine Aktivierung der WNT-Signalkaskaden erfolgt durch den C-Terminus der WNT-Proteine nach einer Bindung der N-terminalen Region an einen Rezeptor [Hoppler et al. 1996]. Durch die Bindung an Rezeptoren der Frizzled-Familie sowie an die Ko-Rezeptoren LRP5/6 (LRP, engl. "LDL-Receptor-related Protein") kommt es zur Weiterleitung des WNT-Signals [Bejsovec 2000; Pandur and Kühl 2001].

Der kanonische Frizzled (Fzd)-Rezeptor besitzt eine N-terminale cysteinreiche Domäne (CRD), an die WNT-Proteine binden können [Dann et al. 2001], sieben transmembrane Domänen und eine cytoplasmatische Domäne. Generell ähnelt die Struktur dieser Frizzled-Rezeptoren den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eine Untergruppe der Fzd-Rezeptoren vermittelt seine Signale über heterotrimere G-Proteine mit nachfolgendem Ca²⁺-Influx und einer Aktivierung der Protein Kinase C [Liu et al. 2001; Liu et al. 1999; Sheldahl et al. 1999].

Die beiden Rezeptoren der LRP-Familie, LRP-5 und LRP-6, sind in der Lage an WNT-Proteine zu binden und bilden zusammen mit den Fzd-Rezeptoren einen

Komplex [Tamai et al. 2000]. Außerdem spielt die Bindung der cytoplasmatischen Domäne des LRP-Rezeptors an den WNT-Antagonisten Axin eine Rolle bei der Aktivierung der WNT-Signalkaskaden [Mao et al. 2001].

Die Aktivität der WNT-Proteine kann durch verschiedene sezernierte Proteine extrazellulär moduliert werden. So binden FRPs (engl. "Frizzled-Related Proteins"), WIF-1 (engl. "Wnt-Inhibitory Factor") und Cerberus direkt an die WNT-Moleküle und verhindern deren Bindung an den Frizzled-Rezeptor [Moon et al. 1997; Hsieh et al. 1999; Piccolo et al. 1999]. Die sog. Dickkopf-Proteine binden dagegen an den extrazellulären Teil von LRP5/6 und blockieren somit die Signalweiterleitung durch WNT [Mao et al. 2001; Nusse 2001; Bafico et al. 2001; Semenov et al. 2001].

1.2 WNT-Signalwege

WNT-Proteine könne drei Signalwege aktivieren. Man unterscheidet zwischen dem kanonischen oder WNT/ß-Catenin-, dem WNT/Ca²⁺- und dem WNT/planaren Zellpolaritäts-Signalweg. Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege hängt davon ab, welches der 19 WNT-Proteine mit welchem der Frizzled-Rezeptoren interagiert und welche Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle stattfinden [Miller et al. 1999; Kühl et al. 2000; Boutros and Mlodzik 1999].

1.2.1 WNT/ß-Catenin-Signalweg

Der kanonische WNT/ß-Catenin-Signalweg reguliert die Zellproliferation und Zelldifferenzierung auf der Ebene der Transkription durch Regulation bestimmter WNT-Zielgene. In der Embryogenese ist dieser Signalweg an der Ausbildung der dorso-ventralen Achse beteiligt, und seine fehlerhafte Regulation führt zu Defekten in der Entwicklung des Embryos. In adulten Organismen ist die Fehlregulation des Signalweges mit der Tumorentstehung in verschiedenen Organen verbunden.

1.2.1.1 WNT/ß-Catenin-Signalweg in nicht stimulierten Zellen

Im Mittelpunkt dieses Signalweges steht das Protein
ß-Catenin, dessen Stabilität durch WNT-Proteine reguliert wird. ß-Catenin enthält in seinem zentralen Bereich zwölf Wiederholungen von 42 Aminosäureresten, den sog. Armadillo-Wiederholungen, die ursprünglich im Drosophila Armadillo-Protein identifiziert wurden. An diese Strukturen können verschiedene Komponenten wie z.B. der TCF Transkriptionsfaktor. das Zell-Adhesions-Protein E-Cadherin. APC (Adenomatous Polyposis Coli Protein) und Axin binden [Liu et al. 2006; Ha et al. 2004; Xing et al. 2003; Eklof Spink et al. 2001; Huber and Weis 2001; Graham et al. 2000]. Am N-Terminus von ß-Catenin befinden sich vier stark konservierte Phosphorylierungsstellen, Serin 33, Serin 37, Threonin 41 und Serin 45, die für die spätere Regulation von
ß-Catenin wichtig sind [Wu et al. 2003].

Ist kein WNT-Signal vorhanden, wird ß-Catenin im sog. Zerstörungskomplex gebunden. Dieser Komplex beinhaltet die Komponenten Axin, APC, die Serin/Threonin Kinase GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3), CK1 (Casein Kinase 1), PP2A (Protein Phosphatase 2A) und ß-TrCP (engl. "ß-Transducin repeat Containing Protein"), ein Element der E3 Ubiquitin Ligase.

Das zentrale Protein dieses Zerstörungskomplexes ist das Tumorsuppressorprotein Axin. Axin und sein Homolog Conductin enthalten eine N-terminale RGS-Domäne (engl "Regulator of G-Protein Signaling"), die an APC bindet. Weiterhin besitzt Axin Bindungsstellen für Dishevelled (Dsh), CK1, GSK3ß und ß-Catenin. Dabei soll Axin als Brücke zwischen GSK3 und ß-Catenin dienen und die GSK3-abhängige Phosphorylierung von ß-Catenin erleichtern. Axin fungiert so als Substrat der GSK3, und die Phosphorylierung von Axin durch GSK3 korreliert mit der Fähigkeit von Axin,
ß-Catenin zu binden. Phosphoryliertes Axin bindet deshalb effizienter ß-Catenin als dephosphoryliertes Axin [Willert et al. 1999]. Der GSK3-Inhibitor Lithium verhindert die Phosphorylierung von Axin, so dass auch eine Interaktion von Axin und ß-Catenin nicht mehr möglich ist [Willert et al. 1999].

Das Adenomatöse Polyposis Coli (APC) Protein fungiert ebenfalls als Tumorsuppressor im Kolorektalkarzinom [Polakis 1997]. APC beinhaltet drei Wiederholungen einer Serin-Alanin-Methionin-Prolin (SAMP) Sequenz [Fodde 2003; Polakis 1997; Fearnhead et al. 2001], welche die Interaktion mit Axin vermittelt, drei Wiederholungen von 15 Aminosäureresten, die an ß-Catenin binden und sieben Wiederholungen einer 20 Aminosäure-Sequenz, die ebenfalls in der Lage sind ß-Catenin zu binden.



Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalweges in einer nicht stimulierten Zelle (A) und in einer Zelle nach Aktivierung durch ein WNT-Signal (B) [modifiziert nach Miller, 2002].

In Abwesenheit von WNT wird ß-Catenin in einem Zwei-Schritt-Mechanismus phosphoryliert (Abb.1A). Zunächst wird ß-Catenin im Zytosol synthetisiert. Anschließend bindet ß-Catenin über die Armadillo-Wiederholungen an den Zerstörungskomplex aus Axin, APC, GSK3ß und Dishevelled. Dann wird Catenin durch die CK1 ϵ (oder CK1 α), welche indirekt über Dishevelled am Zerstörungskomplex bindet, an Serin 45 phosphoryliert, wodurch schließlich eine weitere Phosphorylierung von ß-Catenin an den Serinen 37 und 33 und an Threonin 41 durch GSK3ß ermöglicht wird [Yanagawa et al. 2002; Liu et al. 2002; Amit et al. 2002]. Ist ß-Catenin nun vollständig phosphoryliert, wird es von ß-TrCP, einer Komponente der E3 Ubiguitin Ligase, erkannt und gebunden. Anschließend wird ß-Catenin ubiguitiniert, was zum Abbau von ß-Catenin im sog. Proteasom führt [Kitagawa et al. 1999; Hart et al. 1999]. Folglich ist beim inaktiven WNT/ß-Catenin-Signalweg die zytosolische und nukleäre Konzentration an ß-Catenin gering, was im Zellkern zur Inhibition der Expression der WNT-induzierten Gene führt.

In Abwesenheit von ß-Catenin binden Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (engl. "TCF: T-Cell Factor", "LEF: Lymphoid Enhancer Factor") in den Promotorbereichen der WNT-Zielgene. Die TCF/LEF (TCF-1, TCF-3, TCF-4 und LEF-1) enthalten eine HMG-Box (engl. "High Mobility Group"), über die sie als Monomere an die DNA binden. Die Bindung dieser Faktoren an die DNA verursacht eine starke Krümmung der DNA, wodurch weitere regulatorische Proteine binden können [Dooijes et al. 1993; Giese et al. 1992]. Anders als LEF-1 können TCFs alleine die Transkription der WNT-Zielgene nicht induzieren, sondern benötigen ß-Catenin für die Transaktivierung. Wenn kein WNT-Signal vorhanden ist, wirkt TCF/LEF als Repressor zusammen mit Ko-Repressoren wie CtBP (engl. "C-terminal Binding Protein") und TLE (engl. "Transducin-like Enhancer of split") oder dessen Homolog Groucho in Drosophila [Brannon et al. 1999; Cavallo et al. 1998; Roose et al. 1998]. Groucho ist auch in der Lage die Histon Deacetylase-1 (HDAC1) zu binden, was vermutlich zu einer kompakteren Chromatinstruktur und demnach zur Transkriptionsrepression führt [Chen et al. 1999].

1.2.1.2 WNT/ß-Catenin-Signalweg in WNT-stimulierten Zellen

Die Aktivierung des WNT/β-Catenin-Signalweges erfolgt durch die Bindung eines WNT-Proteins an einen Frizzled-Rezeptor [Wang et al. 1996; Bhanot et al. 1996] und dessen Ko-Rezeptor LRP5/6 [Wehrli et al. 2000; Tamai et al. 2000]. Nach der Bindung eines WNT-Proteins an die beiden Rezeptoren wird LRP5/6 phosphoryliert, wodurch eine Bindung von Axin an den cytoplasmatischen Teil von LRP5/6 ermöglicht wird [Mao et al. 2001; Tamai et al. 2000]. Des weiteren wird Dishevelled durch CK1ε phosphoryliert und fördert möglicherweise die Frat1-vermittelte (engl. "Frequently rearranged in T Cell lymphoma 1") Dissoziation der GSK3ß von Axin [Ruel et al. 1999; Thomas et al. 1999]. Die so ausgelöste Auflösung des Zerstörungskomplexes führt zur Dephosphoryliert wird, und zu APC verringert. Nicht-phosphoryliertes β-Catenin wird in den Zellkern transportiert [Staal et al. 2002; Yost et al. 1996]. Im Zellkern bindet β-Catenin an Mitglieder der

TCF/LEF-Familie. Die Interaktion von ß-Catenin mit diesem Komplex und mit weiteren Aktivatoren führt zur Transkription von WNT-Zielgenen.

1.2.2 Der WNT/Ca²⁺-Signalweg

Im Mittelpunkt des WNT/Ca²⁺-Signalweges steht die Freisetzung von Ca²⁺ in der Zelle und die Aktivierung verschiedener PKCs. Dieser Signalweg kann durch verschiedene WNT-Proteine wie WNT5A und WNT11 **WNTWORLD** "http://www.gcd.med.umn.edu/millerlab/Wnt/wntworld.html."; Kühl et al. 2000] und Fzd-Rezeptoren wie Fzd2 aktiviert werden. Frizzled-Rezeptoren sind in der Lage zu unterscheiden, welcher WNT-Ligand an den Rezeptor bindet und setzen fest, welcher Signalweg aktiviert wird [Yang-Snyder et al. 1996; Sheldahl et al. 1999]. Eine Bindung eines WNT-Liganden führt zu einer Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen [Slusarski et al. 1997; Sheldahl et al. 1999]. Die dadurch freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren die Phospholipase C β , welche Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) umsetzt (Abb.2).



Abbildung 2:Schematische Darstellung des WNT/Ca²⁺-Signalweges [modifiziert nach Miller, 2002].

IP₃ bewirkt eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wodurch Ca²⁺sensitive Proteine, wie die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase (CamKII) und die Proteinphosphatase Calcineurin angeschalten werden. Durch Calcineurin kann es z.B. zu einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (engl. "Nuclear Factor of activated T-Cells") kommen, welcher schließlich in den Kern translociert und dort die Expression verschiedener Zielgene reguliert [Dejmek et al. 2006; Kühl et al. 2000; Miller et al. 1999].

1.2.3 Der WNT/Planare Zellpolarität-Signalweg

Der WNT/Planare-Zellpolarität-Signalweg kontrolliert die Reorganisation des Cytoskeletts. In dieser Signalkaskade sind WNT5A, WNT11 und Fzd7 involviert. Der Signalweg zweigt auf der Ebene von Dsh von der kanonischen Signalkaskade ab. Dsh führt zur Aktivierung der JNK-Kaskade (JNK: Jun N-terminale Kinase), was in der Regulation der Expression verschiedener Zielgene resultiert. Alternativ interagiert Dsh mit der GTPase RhoA und bewirkt die Ausbildung des Dsh-RhoA-Komplexes. Aktives RhoA führt zur Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase und schließlich zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts.

1.2.4 Zielgene der WNT-Signalwege

Die WNT-induzierte Signalkaskaden spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und -progression. Deshalb ist es von großer Bedeutung Zielgene der WNT-Signalkaskaden zu identifizieren. WNT-Signalwege modulieren die Expression von Proteinen mit sehr unterschiedlicher Funktion. Einige dieser Proteine sind Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine und Transkriptionsfaktoren. Eine große Menge der durch WNT regulierten Gene sind an der Regulation der Zellproliferation bzw. des Zellzyklus (c-myc, Cyclin D1, c-Jun) [He et al. 1998; Tetsu and McCormick 1999; Mann et al. 1999], der Zelladhäsion (E-Cadherin, CD44) [Jamora et al. 2003; Wielenga et al. 1999], Tumorinvasion und Metastasierung (COX2, VEGF, MMP7) [Howe et al. 1999; Zhang et al. 2001; Brabletz et al. 1999] und der Apoptose (COX-2, Caspase-3/7, IGF1) [Howe et al. 1999; Chen et al. 2003; Longo et al. 2002] beteiligt.

1.3 Modulatoren der Tumorprogression am Pankreaskarzinom

1.3.1 Kriterien der Malignität

Krebs stellt keine einzelne Krankheit dar, sondern ist eine Bezeichnung für viele verschiedene maligne Krankheitsformen. Der maligne Phänotyp wird durch sechs physiologische Veränderungen definiert [Hanahan and Weinberg 2000]: Autonomie bezüglich Wachstumssignale, keine Empfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose), unbegrenztes Vermehrungspotential, anhaltende Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Gewebemetastasierung.

normalen Gewebe werden die Prozesse der Zellproliferation Im und Zelldifferenzierung streng reguliert. Bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen den wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Signalen kann es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommen, die zur Tumorentstehung führen kann. Abgesehen von den vererbten Formen beruht die Entstehung der meisten Tumore auf somatischen Mutationen. Durch Anhäufung mehrerer genetischer und epigenetischer Veränderungen, durch Vermehrung und Selektion kommt es zunächst zur Entstehung von nicht-invasiven prämalignen Läsionen die Zellen noch gut differenziert sind, und die oder Tumoren, in denen Gewebeorganisation nicht beeinträchtigt ist. Im folgenden Prozess der Tumorprogression entsteht durch zusätzliche genetische Veränderungen ein maligner Tumor, in welchem die Zellen wenig differenziert sind und die Fähigkeit erlangt haben, in die benachbarten Gewebe einzudringen und schließlich in entfernte Organen zu metastasieren. In der lokalen Tumorinvasion dringen die Zellen in die extrazelluläre Matrix ein und können sich dadurch fortbewegen. Metastasierende Zellen können zusätzlich das Endothel eines Blutgefäßes oder eines lymphatischen Gefäßes durchdringen, werden mit dem Blut oder der Lymphflüssigkeit transportiert und setzen sich so in neuem Gewebe ab.

1.3.2 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms beträgt 12 Fälle pro 100000 Einwohner in Westeuropa und stellt die vierthäufigste Todesursache aufgrund eines bösartigen Tumors in den USA dar [Jemal et al. 2007]. Auf Grund seiner schweren Erkennbarkeit im Frühstadium und seiner Resistenz gegenüber Medikamenten und Bestrahlung hat das Pankreaskarzinom eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5% [Beger et al. 2003].

Die aktuelle medizinische Forschung geht davon aus, dass beim Pankreaskarzinom eine mehrstufige Tumorgenese vorliegt, bei der es zu einer Ansammlung verschiedener aktivierender oder inaktivierender Mutationen in Tumorsuppressorgenen Onkogenen und kommt. Diese mehrstufige Tumorzelltransformation weist fortschreitende histologische Veränderungen des Epithels auf, die sog. PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasias)-Läsionen I-III [Hruban et al. 2001]. Die verschiedenen PanIN-Läsionen werden charakterisiert durch strukturelle und zelluläre Abnormalitäten. Im Laufe dieser Tumorzelltransformation findet man unterschiedliche Mutationen in Genen wie K-RAS, CDKN2A/p16INK4A, BRCA2, TP53 und SMAD4 [Wilentz et al. 1998; Wilentz et al. 2000; Luttges et al. 2001; Goggins et al. 2000].

1.3.3 <u>Regulatoren der Tumorprogression im Pankreaskarzinom</u>

Tumorbiologische Untersuchungen zeigten, dass Tumorzellen nach der Transformation häufig verschiedene Wachstumsfaktoren in autokriner oder parakriner Weise exprimieren. Unter anderem sind im Pankreaskarzinom der epidermale Wachstumsfaktor EGF mit seinem Rezeptor, der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor IGF-I, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF und TGF α überexprimiert [Sakorafas et al. 2000; Ozawa et al. 2001; Korc 1998; Ellenrieder et al. 1999]. Des weiteren werden Wachstumsfaktoren der TGFß-Familie in vielen Pankreaskarzinomen dysreguliert. Mitglieder der TGFß-Familie kontrollieren grundlegende Funktionen wie Proliferation, Migration [Massague 1998], Invasion [Seton-Rogers et al. 2004] und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

[Grunert et al. 2003]. In nicht-transformierten Zellen hemmt TGFß die Proliferation, wirkt jedoch in fortgeschrittenen Tumorstadien tumorprogressiv und es kann eine gesteigerte Invasion und Metastasierung beobachtet werden [Roberts and Wakefield 2003; Ellenrieder et al. 2001; Welch et al. 1990].

1.3.3.1 CUTL1 in der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms

Ein Zielgen von TGFß ist der Transkriptionsfaktor CUTL1. CUTL1, auch bekannt als CDP (engl. "CCAAT displacement protein"), Cut oder Cux-1 gehört zur Familie der homeobox Transkriptionsfaktoren und ist an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt [Nepveu 2001]. CUTL1 besitzt vier DNA-Bindestellen, von denen drei als sog. Cut-Wiederholungen und eine als Cut-Homeodomäne bezeichnet wird [Harada et al. 1995].

Studien mit dem Maus-Homolog Cux-1 zeigten bereits, dass eine Repression von Cux-1 zu einem verminderten Zellwachstum und Differenzierung von Lungenepithelien, Haarfolikeln und zu einer fehlerhafter T- und B-Zell Funktion führte [Sinclair et al. 2001; Ellis et al. 2001; Luong et al. 2002]. Des weiteren wurde CUTL1 als Mediator der Tumorzellmotilität und Invasivität in verschiedenen Tumorgeweben *in vitro* und *in vivo* beschrieben [Michl and Downward 2006; Michl et al. 2005].

Mit Hilfe der RNAi Technologie und Mikroarray Expressionsprofilen konnten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits Zielgene des Transkriptionsfaktors CUTL1 identifiziert werden. Viele dieser Gene fungieren als Modulatoren der Tumorprogression in verschiedenen Modellsystemen. Hierzu zählen z.B. Pleiotrophin, ein sezernierter Wachstumsfaktor, welcher das Zellwachstum und die Metastasierung in mesenchymalen Zellen reguliert [Chauhan et al. 1993], und das Glykoprotein WNT5A.

1.3.3.2 Die Rolle der WNT-Signalkaskade bei der Tumorgenese und – progression

Die WNT-Signalkaskade spielt bei der Tumorprogression eine große Rolle. Die Expression verschiedener Mitglieder der WNT-Proteinfamilie wie WNT1, WNT3A,

WNT7A und in geringerem Ausmaß der Proteine WNT2, WNT5B und WNT7B führt zu einer Zelltransformation in verschiedenen Systemen [Wong et al. 1994; Jue et al. 1992]. WNT4, WNT5A und WNT6 hatten in diesen Systemen keine Auswirkung auf die Zelltransformation [Wong et al. 1994]. Mutationen in den einzelnen WNT-Genen konnten bisher noch nicht mit gesteigerter Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. Allerdings kann eine fehlerhafte Signalweiterleitung durch Mutationen in verschiedenen Komponenten der Signalkaskaskade zu einer verstärkten Tumorprogression führen. Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) entwickeln eine Vielzahl intestinaler Tumore und besitzen Keimbahn-Mutationen im APC-Gen. Diese Mutationen treten in 80% der kolorektalen Kerzinome auf. Bei 95% dieser Mutationen resultiert dies in einer nicht funktionsfähigen Form des APC-Proteins. So können die Bindungsstellen von ß-Catenin und Axin oder die putativen Phosphorylierungsstellen der GSK3ß betroffen sein [Polakis 1997]. Dadurch kann ß-Catenin nicht mehr phosphoryliert und degradiert werden und eine verstärkte Transkription verschiedener Zielgene kann erfolgen. Durch eine Mutation im dritten Exon von
ß-Catenin (CTNNb1) kann
ß-Catenin auch nicht mehr phosphoryliert werden [Polakis 2000]. Eine Tumorprogression kann somit von der Stabilisierung von ß-Catenin abhängig sein.

1.4 Die Apoptose-Signalkaskade und dessen Regulation durch WNT-Proteine

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes. Dieser kann entweder von außen, z.B. durch Immunzellen (extrinsischer Weg) oder aufgrund von zellinternen Prozessen (intrinsischer Weg) ausgelöst werden. Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Während bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle einsetzt und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke stattfindet, schwillt bei der Nekrose die Zelle an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen, da Cytoplasma und

11

Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden und durch Makrophagen beseitigt werden müssen.

Bei der Apoptose spielt eine Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen, sogenannte Caspasen, eine zentrale Rolle. Caspasen arbeiten stark substratspezifisch und liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor, die erst durch Proteolyse zu funktionsfähigen Enzymen reifen. Caspasen können sich gegenseitig aktivieren und bilden eine sog. Caspase-Kaskade. Je nach Aktivierungsart und Substrat kann man sie in Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilen. Initiator-Procaspasen stehen immer am Anfang einer Caspase-Kaskade. Ihre Autoaktivierung kann durch ein äußeres (extrinsisches) oder ein zellinternes (intrinsisches) Signal ausgelöst werden. Aktivierte Initiator-Caspasen mobilisieren verschiedene Effektor-Procaspasen, die ebenfalls im Cytoplasma vorliegen. Als Effektor-Caspasen werden die Caspasen-3, -6 und –7 bezeichnet, da sie an der Fragmentierung des Zellinventars beteiligt sind [Slee et al. 2001].

1.4.1 TRAIL-induzierte-Apoptose

TRAIL (engl. "Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand") gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren [Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996]. Die Aufgabe von TRAIL ist es, Zellen zu inaktivieren, indem es Apoptose in der Zielzelle auslöst. TRAIL ist ein Membranprotein vom Typ II und kann am C-Terminus proteolytisch gespalten werden, so dass es auch als ungebundener Ligand vorkommt. Sowohl gebundenes, als auch freies TRAIL kann in verschiedenen Tumorzellen Apoptose auslösen.

TRAIL kann mit fünf verschiedenen Rezeptoren interagieren. Dazu gehören zwei Todesrezeptoren, DR4 und DR5, zwei sog. "Decoy-Rezeptoren", DcR1 und DcR2 [Sheridan et al. 1997; MacFarlane et al. 1997; Degli-Esposti et al. 1997] und Osteoprotegrin (OPG), ein Rezeptor ohne transmembrane Domäne [Emery et al. 1998]. Bindet nun TRAIL an den DR4/5-Rezeptor (Abb.3) kommt es zur Ausbildung eines Apoptose-induzierenden Komplexes, der aus dem trimerisierten Rezeptor, dem Adaptor-Protein FADD (engl. "Fas-associated death domain protein") und der Procaspase-8 bzw. –10 [Seol et al. 2001] besteht. Die aktivierte Caspase-8 kann nun entweder die Effektor-Caspase-3 anschalten oder durch

Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2 Protein-Familie, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochiondrien und die daraus resultierende Aktivierung der Caspase-9 initiieren [Luo et al. 1998; Li et al. 1998]. Caspase-9 kann wiederum die Effektor-Caspase-3 aktivieren und so die Apoptose einleiten.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der TRAIL-induzierten Signalkaskade.[modifiziert nach http://www.dkfz-heidelberg.de/immungenetik/pathway.jpg

1.4.2 Die Rolle der WNT-Signalkaskade in der Apoptose

Über die WNT-Signalkaskaden wird die Expression einiger Gene reguliert, die an der Apoptose beteiligt sind (s. 1.2.4). So kann es durch Mutationen in den WNT-Signalkaskaden zur Fehlregulation anti-apoptotischer Faktoren kommen. Eine Mutation im APC-Gen ist an der Dysregulation verschiedener physiologischer

Prozesse, wie der Zellzyklus-Progression, Migration und Apoptose beteiligt [Goss and Groden 2000]. So ist APC in der Lage Apoptose in einem von ß-Catenin unabhängigen Mechanismus zu induzieren [Qian et al. 2007; Steigerwald et al. 2005]. Des weiteren kann ß-Catenin antiapoptotisch wirken. Eine Expression von ß-Catenin führt so zu einer erhöhten Proliferations- und einer verminderten Apoptoserate. Mutationen im ß-Catenin-Gen können zur Expression einer stabilen Form von ß-Catenin führen, die eine fehlerhafte Expression der Zielgene c-myc und Cyclin D1 der WNT-Signalkaskade zur Folge hat [Orford et al. 1999]. Durch Aktivierung der WNT-Signalkaskaden durch z.B. WNT1 und WNT5A konnte

bereits eine Inhibierung der Apoptose in Rat-1 und MC3T3-Zellen aufgezeigt werden [Chen et al. 2001; Almeida et al. 2005].

1.5 Die Rolle von WNT5A bei der Tumorprogression

WNT5A kann unterschiedliche Reaktionen während der Tumorprogression auslösen. So wirkt WNT5A in hematopoetischem Gewebe, in Brust- und uroepithelialem Krebsgewebe als Tumorsuppressor und inhibiert die Tumorzellproliferation [Liang et al. 2003; Olson and Gibo 1998; Olson et al. 1997, Jonsson et al. 2002, Kremenevskaja et al. 2005]. Außerdem dient WNT5A als prognostischer Marker bei Brust- und Darmkrebs [Dejmek et al. 2005; Dejmek et al. 2005].

Im Gegensatz dazu fördert WNT5A auch als Onkogen die Zellmotilität und Invasivität in Melanomzellen [Weeraratna et al. 2002] und ist in malignen Lungen-, Magen-, Kolon- und Prostatakarzinomen stark exprimiert [Lejeune et al. 1995; Huang et al. 2005; Saitoh et al. 2002; Iozzo et al. 1995, Kurayoshi et al. 2006; Saitoh and Katoh 2002; Taki et al. 2003; Huang et al. 2005].

Die Rolle von WNT5A bei der Aktivierung der verschiedenen Signalwege ist noch unklar. So wirkt WNT5A in C57MG Zellen und in *Xenopus laevis* als Antagonist des WNT/ß-Catenin-Signalweges [Slusarski et al. 1997; Torres et al. 1996; Olson and Gibo 1998,Topol et al. 2003]. In den meisten Zellsystemen aktiviert WNT5A allerdings die nicht-kanonische Signalkaskade [Mikels and Nusse 2006; Liang et al. 2003; Kuhl et al. 2000].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Den WNT-Signalkaskaden kommt eine große Bedeutung sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in der Krebsentstehung zu. Ziel dieser Arbeit war es das Protein WNT5A als Zielgen des Transkriptionsfaktors CUTL1 zu untersuchen. Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Wird WNT5A durch den Transkriptionsfaktor CUTL1 im Pankreaskarzinomzellen reguliert?
- Vermittelt CUTL1 seine Effekte auf Migration und Invasion über WNT5A?
- Ist WNT5A an der Regulation verschiedener EMT-Markerproteine beteiligt?
- Welche Signalkaskade wird durch WNT5A in Pankreaskarzinomzellen aktiviert?
- Wie stark ist WNT5A im Pankreaskarzinom und in Vorläuferläsionen exprimiert?
- Welche Rolle spielen CUTL1 und WNT5A in der TRAIL-induzierten Apoptose?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

2100 Agilent Bioanalyser ABI Prism 7700 Sequence **Detector System BioPhotometer** Brutschrank WTB Binder Certomat R + H 5100 Cryo 1°C Freecing Container "Mr.Frosty" DLReady[™] Luminometer Elektrophoresekammer SLT Spectra Elisa Photometer FACSCalibur Durchflußzytometer Feinwaage Mettler PM4000 Hybridisierungsofen Inolab® pH720 Lab Dancer Liquid Scintillation Counter Wallace 1410 Mikroskop Mini Protean 3 MJ Research PTC-200 Pipetten PowerPac HC Power Supply Roto Shake Genie Savant SpeedVac SVC100 Sterilbank LaminAir HBB2448 Thermoblock Dri-Block DB3

Agilent Technologies (CA, USA) Applied Biosystems (CA, USA))

Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) Heraeus Instruments (Dreieich) B.Braun Biotech International (Melsungen) Nalgene Labware (Wiesbaden)

Berthold Technologies (Bad Wildbad) BioRad (München) Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim) Becton Dickinson (Heidelberg) Mettler-Toledo GmbH (Gießen) Heraeus Instruments (Dreieich) WTW (Weilheim) IKA (Staufen) Pharmacia (Freiburg)

Zeiss (Oberkochen) BioRad (München) GMI (Minnesota, USA) Corning (MA, USA) BioRad (München) Scientific industries (NY, USA) GMI (Minnesota, USA) Heraeus Instruments (Dreieich) Techne AG (Jahnsdorf)

Trans-Blot	BioRad (München)
Vortexer MS1 Minishaker	IKA (Staufen)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik (Uetze)
Zentrifugen	
5417R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
5417C	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Multifuge 1	Heraeus Instruments (Dreieich)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cronex, Röntgenfilm Deckgläschen Einmal-Injektionskanülen Einwegspritzen (1 ml, 50 ml) Konische Röhrchen, Polypropylen (15 ml, 50 ml) Kryogefäße Kultivierungsplatten (6, 12, 24, 96 Vertiefungen) Matrigel[™] Invasions Kammer, Porengröße 8 µm Objektträger Pasteurpipetten PVDF-Membran, Immonilon-P Reaktionsgefäße (0,5 ml,1 ml,2 ml) Rundbodenröhrchen, polystyren Sterile Einmal-Pipetten Sterilfilter (0,2µm) Thermo-Fast®96Detection-Plate UV-Küvetten micro, Plastibrand® Whatman Gel Blotting Papier Zellkultureinsatz, Porengröße 8 µm Zellkulturflaschen und -schalen Zellschaber

Agfa (Köln) Menzel-Gläser (Braunschweig) B. Braun Melsungen AG (Melsungen) Becton Dickinson (Heidelberg) Becton Dickinson (Heidelberg)

Nalgene Labware (Wiesbaden) Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Becton Dickinson (Heidelberg)

Menzel-Gläser (Braunschweig) Brand GmbH (Wertheim) Millipore GmbH (Schwalbach) Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) Becton Dickinson (Heidelberg) Becton Dickinson (Heidelberg) Nalgene Labware (Wiesbaden) Abgene (Hamburg) Brand GmbH (Wertheim) Schleicher & Schüll (Dassel) Becton Dickinson (Heidelberg) Greiner Bio-One (Frickenhausen) Sarstedt (Nürnbrecht)

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht in der jeweiligen Methodenbeschreibung vermerkt, werden alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien von Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka (Buchs SG, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche Molecular Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.1.4 Radiochemikalien

[methyl- ³ H]Thymidin	Amersham Biosciences (Freiburg)
50 Ci/mmol	
1mCi/ml	

2.1.5 Standards

DNA-Standard	
SmartLadder	Eurogentec (Seraing, Belgien)
(200bp-10000bp)	
Protein-Standard	
Full-Range Rainbow	Amersham Biosciences (Freiburg)
Molecular Weight Marker	
PageRuler [™] Prestained	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Protein Ladder	

2.1.6 Vektoren und Konstrukte

Tabelle	1:	Luciferase-Konstrukte
---------	----	-----------------------

Name	Promotorabschnitt	Herkunft/Referenz
pGL3-Enhancer		Fa. Promega, Mannheim, Germany
pGL3-WNT5A	potentielle WNT5A Promorregion, 2kb	Michl <i>et al.,</i> Cancer Cell. 2005 Jun;7(6):521-32
TOPflash	TCF Bindungselement	Fa. Upstate, Schwalbach, Deutschland
FOPflash	mutiertes TCF-Bindungselement	Fa. Upstate, Schwalbach, Deutschland

Tabelle 2: Expressionskonstrukte

Name	Insert	Vektor	Herkunft/Referenz
full lengh CLITL 1	humanaa CLITL 1	рМХ	A.Nepveu, McGill Universität,
			Quebec, Kanada
	humanes CUTL1,	nY 142	A.Nepveu, McGill Universität,
COTE 188031-1550	nt2534-4051	ρχj42	Quebec, Kanada
bl of1			D. Wedlich, Universität Karlsruhe,
nilen			Deutschland
d n hl of1			D. Gradl, Universität Karlsruhe,
u.n.neen			Deutschland
pBig2i/WNT5A	ORF WNT5A	pBig2i	selbst hergestellt
nDia2i			J.R. Hall, The John P. Robarts Research
ואסופבו			Institute, Ontario, Kanada
lacZ			Fa. Promega, Mannheim, Germany

2.1.7 Enzyme

β-Galaktosidase	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase	ABgene (Hamburg)
Calf intestinal alkaline Phosphatase	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
CaM Kinase II, active	Upstate (Schwalbach)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim)

2.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Die Oligonukleotide wurden mit A. dest. auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei –20°C gelagert. Die verwendeten siRNAs wurden mit RNAse-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 nmol/ml eingestellt.

Tabelle 3: verwendete siRNA

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
hCUTL1_1	5'- GGAACAGAAGUUACAGAAUtt- 3'	Ambion, Austin, Texas,USA
hCUTL1_2	5'- GGAAGCUGAAGCAGCUUUCtt- 3'	Ambion, Austin, Texas, USA
hWNT5a_1	5'- GGUUGUAAUUGAAGCCAAUtt- 3'	Ambion, Austin, Texas, USA
hWNT5a_2	5'- GGACUUUCUCAAGGACAGAtt- 3'	Ambion, Austin, Texas, USA
negativ Kontrolle	Silencer Negative Control #1 siRNA	Ambion, Austin, Texas,USA

Tabelle 4: PCR-Primer für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz	Restriktionsenzym
hWNT5A ORFfor	5'- G <u>GGGTACCC</u> CATGAAGAAGTCCATT -3'	KpnI
hWNT5A ORFrev	5'- G <u>GACTAGTC</u> CCTACTTGCACACAAA -3'	SpeI

Tabelle 5: Primer für RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
hCUTL1_for	5'- CCAAGCTGCGGGAGAATTC -3'
hCUTL1_rev	5'- CAGCCTGGCCTTTGAGTTTTT -3'
hWNT5A_for	5'- GTGGCCCTGCTGTGATCAT –3'
hWNT5A_rev	5'- TTCAACCCAACACGCATTTC –3'
Cyclophilin_for	5'- CCCTCCACCCATTTGCT -3'
Cyclophilin_rev	5'- CAATCCAGCTAGGCATGGGA -3'
RPLP0_for	5'- GTCGGAGGAGTCGGACGAG -3'
RPLP0_rev	5'- GCCTTTATTTCCTTGTTTTGCAAA -3'

2.1.9 Antikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprungs- organismus	Spezifität	Herkunft/bezogen von	
Anti-beta-Aktin	Maus	Mensch, Ratte, Kaninchen	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)	
Anti-beta-Catenin	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Caspase-3	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Cleaved-Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Caspase-8	Maus	Mensch	Merck (Darmstadt)	
Anti-CUTL1	Kaninchen	Mensch	Michl et al., Cancer Cell 2005	
Anti-E-Cadherin	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-GSK3beta (27C10)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Lamin A/C	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho-GSK3beta (Ser9)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho-PKC(pan) (betall Ser660)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho- PKCalpha/betall (Thr638/641)	Kaninchen	Mensch, Maus, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho-PKCdelta (Thr505)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe, Hamster	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho- PKCdelta/theta (Ser643/676)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho- PKD/PKCµ (Ser744/748)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	
Anti-Phospho- PKD/PKCµ (Ser916)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)	

Anti-Phospho- PKCtheta(Thr538)	Kaninchen	Mensch, Ratte, Affe, Rind	Cell Signaling Technology (MA, USA)
Anti-Phospho- PKCzeta/lambda (Thr410/403)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe	Cell Signaling Technology (MA, USA)
Anti-PARP	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	Cell Signaling Technology (MA, USA)
Anti-Vimentin	Ziege	Mensch	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Anti-WNT5A	Ziege	Mensch, Maus	R&D Systems (MN, USA)

Tabelle 7:Sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus, Spezifität	Herkunft/Bezogen von
Anti-Goat IgG	Kaninchen	Dianova (Hamburg)
Anti-Mouse IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Anti-Rabbit IgG	Esel	Amersham Biosciences (Freiburg)

2.1.10 <u>Reagenziensets "Kits"</u>

CaM Kinase II Assay Kit	Upstate (Schwalbach)
Caspase-Glo®3/7	Promega (Mannheim)
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche Diagnostics (Mannheim)
DeadEnd [™] Fluorometric	Promega (Mannheim)
TUNEL System	
MessageAMPt aRNA Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
NucleoSpin®Plasmid	Machery-Nagel GmbH (Düren)
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAShreeder	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy® Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Vectastain [®] ABC Kit	Vector Laboratories (CA, USA)

2.1.11 <u>Nährmedien</u>

Nährmedien für die Bakterienkultur:

LB-Flüssigmedium	10g Typton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl auf 100		
	ml H ₂ O, nach Bedarf 100 μ g/ml Ampicillin		
LB-Agarplatten	10g Typton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, 15g		
	Bacto-Agar auf 1000 ml H ₂ O, nach Bedarf		
	100µg/ml Ampicillin		
Nährmedien, Antibiotika und Zu	sätze für die Zellkultur:		
Doxycyclin	Sigma-Aldrich GmbH		
	(Steinheim)		
Dulbecco's Modified Eagle Med	um (DMEM) Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)		

2.1.12 Biologisches Material

Fötales Kälberserum (FCS)

Hygromycin B Normocin[™]

Puromycin

Bakterienstämme:

Max Efficiency DH5 α^{TM} Competent Cells (Invitrogen, Karlsruhe)

Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Sigma-Aldrich GmbH

Amaxa (Köln)

(Steinheim)

Zelllinien:

Tabelle 8: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungs- medien	Herkunft	Referenz
Panc-1	humanes Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS	ATCC, American Type Culture Collection, Manassas (VA), USA	Int Nat Cancer Inst 1975;15:741
Panc-1 pRS- shCUTL1	Panc-1 ; stabil transfiziert mit pRS- shCUTL1, welches zu einer stabilen Repression von CUTL1 führt	DMEM + 10% FCS + 2,5 µg/ml Puromycin		Michl <i>et al</i> ., Cancer Cell 2005
Panc-1 pBig2i/WNT5A	PANC-1; stabil transfiziert mit pBig2i/WNT5A, welches die Induktion der WNT5A- Expression ermöglicht	DMEM + 10% FCS + 400 µg/ml Hygromycin B	Selbst hergestellt	Ripka <i>et al</i> ., Carcinogenesis 2007
ImimPC-1	humanes Pankreaskarzinom/ Lebermetastase	DMEM + 10% FCS	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spain	Lab Invest. 1995 Apr;72(4):395- 404
MiaPaCa-2	humanes Pankreaskarzinom	DMEM + 10% FCS	EDACC, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK	Int J Cancer 1977;19:128
PaTu-8988t	humanes Pankreaskarzinom/ Lebermetastase	DMEM + 10% FCS	DSMZ, Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland	Virchows Archiv B Cell Pathol 1992;61:295-306
HT 1080	humanes Fibrosarkom	DMEM + 10% FCS	EDACC, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK	Cancer 1974;33:1027- 1033

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium (Fa. Gibco, Invitrogen); FCS = fötales Rinderserumalbumin

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Methoden im Umgang mit DNA

• Klonierung des WNT5A-Expressionskonstruktes pBig2i/WNT5A

Zur Herstellung des WNT5A-Expressionskonstruktes wurde die Open Reading Frame (ORF) von WNT5A in das induzierbare Plasmid pBig2i kloniert, so dass durch eine Zugabe von Doxycyclin (2µg/ml) die Expression von WNT5A induziert wurde.

• Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR (engl. "polymerase chain reaction") ist eine Methode zur *in vitro* Nukleinsäure-Amplifikation. Dabei wird in einem PCR-Zyklus eine bestimmte DNA-Sequenz mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase und zweier etwa 20 bp langer Oligonukleotide (Primer) in einem geeigneten Puffer amplifiziert.

Ein Standard PCR-Programm besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen Matrize bei 94°C, einer Anlagerung der Primer bei 52°C (Annealing) und einer Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase bei 72°C (Elongation). Die Anzahl der Zyklen richtet sich nach individuellen Ansprüchen, die Anlagerungstemperatur ist vom GC-Gehalt der Primer abhängig.

Um die ORF von WNT5A zu amplifizieren wurde als Template der humane cDNA clone MGC:71588 IMAGE:30346200 und die Primer hWNT5A ORFfor und hWNT5A ORFrev verwendet. Die ideale Annealing-Temperatur wurde über eine Gradienten-PCR ermittelt, so dass folgender PCR-Ansatz und folgendes PCR-Programm zur Amplifikation verwendet wurden.

PCR-Ansatz:	38	μΙ	H ₂ O
	5	μΙ	10 x Thermo-Start Reaktion Buffer
	3	μΙ	MgCl ₂
	1	μΙ	dNTP
	0,5	μl	hWNT5A ORFfor (20pmol)
	0,5	μl	hWNT5A ORFrev (20pmol)
	1	μl	Template
	1	μl	Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase
	0,5 1 1	μl μl μl	hWNT5A ORFrev (20pmol) Template Thermo-Start Taq-DNA-Polymeras

PCR-Programm:	Vorabdenaturierung	94°C; 4 min	
	Denaturierung	94°C; 30 sec	
	Annealing	56°C; 30 sec	40 Zyklen
	Elongation	72°C; 1 min	
	End-Elongation	72°C; 4 min	

Die Aufreinigung des entstandenen PCR-Produktes erfolgte durch eine Gelelution mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen).

Restriktion von DNA

Für das Spalten von DNA bzw. von Plasmid-DNA wurden in der vorliegenden Arbeit Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Der Vorteil dieser Endonukleasen liegt in der hochspezifischen Sequenzerkennung und somit in ihren definierbaren Schnittstellen. Für die verwendeten Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubations-Temperaturen und Puffer verwendet. Die Menge an eingesetztem Enzym entsprach maximal 1/10 Volumen des Gesamtansatzes.

Für die Linearisierung des Vektors pBig2i und zur Restriktion des PCR-Produktes mit anschließender Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

Ansatz (50µl):	8-10 µg	DNA (pBig2i bzw. PCR-Produkt)	
	5 µl	Buffer 1 (NEB)	
	1 µl	KpnI	
	1 µl	SpeI ad 50 µl H ₂ O	

• Dephosphorylierung des Vektors durch Calf Intestine Phosphatase (CIP)

Eine Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde durchgeführt, um eine Religation des Vektors zu verhindern und somit die Effizienz der Klonierung zu erhöhen. Die hier verwendete Calf Intestine Phosphatase (CIP) besitzt die Eigenschaft, 5'-Phosphat-Gruppen, die zur Ausbildung von Phosphodiesterbindungen nötig sind, von DNA bzw. RNA abzuspalten und so eine unerwünschte Religation des Vektors zu verhindern.

Nach der Restriktion von pBig2i wurden dem Ansatz 1/10 Volumen 10x CIP-Puffer und 1,5 µl CIP zugegeben und dieser für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym konnte anschließend für 10 Minuten bei 75°C inaktiviert werden. Der geschnittene Vektor wurde im Anschluss durch eine Gelextraktion aufgereinigt.

• Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von Vektor und Insert wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, ATP-abhängig doppelsträngige DNA durch die die Bildung von Phosphodiesterbindungen verknüpft. Für die Ligation des dephosphorylierten pBig2i-Vektors und des Inserts (ORF WNT5A) wurden bei einem 20 µl-Ansatz 200-500 ng Vektor-DNA und eine dreifache Menge an Insert-DNA eingesetzt. Dem Ansatz wurden 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und anschließend bei 16°C über Nacht inkubiert.

• Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden 100 μl kompetente *E. coli* DH5α zum Ligationsansatz (pBig2i/WNT5A) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und eine anschließende Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 300 μl LB-Medium folgte eine Inkubation bei 37°C und einer Rotation bei 100rpm für 60 Minuten. Ein Teil dieses Ansatzes wurde dann auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden aus den erhaltenen Bakterienkolonien eine 5 ml-Übernachtkultur mit Zusatz von Ampicillin angeimpft.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von pBig2i/WNT5A aus *E.coli* DH5α erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®Plasmid Kits bzw. QIAGEN®Plasmid Maxi Kits nach Angaben des Herstellers ausgehend von einer 5 ml bzw. 200 ml Übernachtkultur mit Zusatz von Ampicillin.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Art der Extraktion diente zur Abtrennung von Proteinen aus DNAhaltigen Lösungen. Hierzu wurde die DNA-haltige Lösung mit 1 Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere, wässrige, DNAhaltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde nun abgenommen und einer Ethanolfällung unterzogen.

Fällung von DNA/RNA

Zur Ankonzentrierung von DNA/RNA wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (100%) wurde die DNA/RNA bei –20°C für mindestens 2 Stunden gefällt. Anschließend wurde die DNA/RNA für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet bei 37°C getrocknet, in einem kleinen Volumen 10 mM Tris/HCI (pH 7,6) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf) bestimmt. Die Messung erfolgte in UVdurchlässigen Einmalküvetten (Brand) gegen eine Referenzlösung, die den entsprechenden Puffer darstellte, in dem die Nukleinsäure gelöst bzw. verdünnt war. Eine relative Absorption von 1 (OD = 1) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml bei einzelsträngiger DNA/RNA.

• Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach auftrennen. Die DNA bewegt sich dabei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die angelegte Spannung, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentation und die Molekülgröße der DNA beeinflusst. Zur Visualisierung der DNA wurde Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen der DNA, bzw. RNA, wodurch sich das Anregungsspektrum verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird.

Die Auftrennung erfolgte über ein 1%iges TAE-Agarosegel mit 5 µl/100ml Ethidiumbromid bei 80-120 mV. Als Laufpuffer diente 1x TAE.

Agarosegel:	1	g	Agarose
	100	ml	1x TAE-Puffer
1x TAE-Puffer:	40	mМ	TrisBase
	20	mМ	Acetat
	1	mМ	EDTA

2.2.1.2 Methoden im Umgang mit RNA

• Isolierung von RNA aus Zelllinien

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die kultivierten Zellen wurden hierzu mit einem 2-Mercaptoethanol-haltigen RLT-Lysispuffer lysiert und mit Hilfe von QIAshredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Anschließend wurde die RNA über eine Silicagel-Membran nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Ein DNase-Verdau erfolgte hierbei auf der Silicagel-Membran. Die RNA wurde nach der Aufreinigung mit Ethanol gefällt (s. 2.2.1.1).
• Isolierung von RNA aus Geweben

In dieser Arbeit wurde RNA aus mikrodissoziierten Pankreasgeweben von jeweils 5 Patienten isoliert. Es wurden normales Pankreasgewebe, pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN1-3) und Gewebe aus pankreatischen Adenokarzinomen verwendet und RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gewonnen. Geringe RNA-Mengen wurden mit dem MessageAMP aRNA Kit (Ambion) unter Anwesenheit von UTP und 5-(3-aminoallyl)-UTP amplifiziert. Die Qualität und Quantität der RNA wurde mit einem 2100 Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies) kontrolliert.

cDNA-Synthese

Die gefällte RNA wurde zunächst in 11 μ l H₂O aufgenommen und 0,5 μ g Random-Hexamer-Primer zugegeben. Die Primeranlagerung erfolgte bei 70°C für 10 Minuten mit einer anschließenden Abkühlung auf Eis. Die First-Strand-Synthese der cDNA erfolgte mit folgendem Ansatz:

Ansatz für Reverse Transkription:

RNA/Random-Hexamer-Primer

- + 4 µl First Strand Buffer
- + 2 μl 0,1 M DTT
- + 1 µl 10 mM dNTP
- → Inkubation bei 42°C für 2 Minuten
- + 1 μl Reverse Transkriptase Superscript II
- → Inkubation bei 42°C für 50 Minuten

Nach Beendigung der cDNA-Synthese erfolgte eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 72°C für 10 Minuten. Die cDNA wurde mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels kontrolliert.

Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip einer PCR beruht und eine zusätzliche Quantifizierung ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen. Das hier verwendete SYBR®Green (Applied Biosystems) ist in der Lage, an doppelsträngige DNA zu binden, wodurch die Amplifikation der cDNA verfolgt werden kann.

Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detector Systems (Applied Biosystems) und dem SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Die verwendeten Primer (s. Tabelle 5) wurden mit der PrimerExpress® Software ausgewählt. Das ribosomale Protein RPLP0 (NM_001002) diente als Referenzgen.

Ansatz:	25	μΙ	SYBR®Green PCR Master Mix
	5	μΙ	Primer-Mix
	0,25	μΙ	cDNA
	19,75	μΙ	H ₂ O
Primer-M	lix: 6	μΙ	Primer_for (20pmol)
	6	μΙ	Primer_rev (20pmol)
	28	μΙ	H ₂ O

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Proteinen aus Zelllinien

• Gesamt-Protein

Zur Isolierung von Gesamtzelllysat wurden die Zellen zunächst mit 1 x PBS gewaschen und mit einer angemessenen Menge Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Inkubation auf Eis für 15 Minuten wurden die Zellen durch mehrmaliges aufziehen einer Kanüle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm entfernt. Die fertigen Lysate wurden anschließend bei –20°C gelagert.

1 x PBS:	8	g	NaCl				
	0,2	g	KCI				
	1,44	g	Na ₂ HI	PO ₄			
	0,24	g	KH ₂ P	O ₄			
	pH 7,	4, ad 1	000 ml	H ₂ O			
Lysepuffer (500 ml):			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 Coi	nplete	Protease Inhibitor	Tablette	(Roche
			Diagn	ostics)	pro 10 ml frisch zug	jeben	

• Nukleäre und cytoplasmatische Proteine

Um nukleäre und cytoplasmatische Extrakte zu erhalten, wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers in Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten bei 1600 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200-400 µl Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels einer Kanüle (0,45 mm Durchmesser). Die Zellkerne und trümmer wurden bei 6800 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand (= cytoplasmatische Proteine) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um nukleäre Proteine zu isolieren, wurde das Pellet in 30-100 µl Puffer C aufgenommen, für 30-60 Minuten im Kühlraum auf einem Rotor inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 14000 rpm Überstand (=Kernproteine) zentrifugiert. Der wurde in neuen Eppendorfgefäßen bei –80°C gelagert.

Puffer A:	10	mМ	HEPES pH 7,9
	10	mМ	KCI
	0,1	mМ	EDTA
	0,1	mМ	EGTA
	1	mМ	DTT (frisch zugeben)
Puffer C:	20	mМ	HEPES pH 7,9
	0,4	М	NaCl
	1	mМ	EDTA
	1	mМ	EGTA
	1	mМ	DTT (frisch zugeben)

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Bradford-Methode ermittelt. Es wurde das BIO-RAD Protein Assay Reagenz (BIO-RAD) verwendet, das zunächst 1:5 mit Wasser verdünnt wurde. Für die so angesetzte Lösung wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA, 2-12 µg/ml) erstellt. Zu 500 µl verd. Reagenz wurden dann 1-5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Bei der Bindung von dem in der Reagenz enthaltenen Coomassie brilliant blue G-250 Proteine verschiebt sich das an Absorptionsmaximum der Farbe (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Probe, die dann über die Eichgerade ermittelt wurde.

2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Mit der denaturierenden SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) lassen sich Proteine aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen. SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) lagert sich hierbei mit seinem langen hydrophoben Bereich mehrfach an die Proteine an, was zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine führt. In dem verwendeten pH-Bereich der SDS-PAGE sind alle Proteine daraufhin negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Kleinere Proteine können leichter durch die Poren des Geles wandern und

gelangen schneller zur Anode als größere Proteine. Zur Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurden in dieser Arbeit 10%ige Trenngele oder sog. Gradientengele (8-16%Precise[™]Gel; Pierce) verwendet.

Die Proben für die SDS-Gelelektrophorese wurden mit einem 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Polyacrylamidgele geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 16 mA/Gel. Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membranen übertragen.

Trenngel (10%):	4,1	ml	H ₂ O			
	2,6	ml	Trenr	ngelpuffer		
	3,3	ml	30%	Acrylamid		
	100	μΙ	10%	SDS		
	50	μl	10% Ammoniumpersulfat (APS			
	10	μΙ	TEM	ED		
Sammelgel:	3	ml	H ₂ O			
	1,3	ml	Samr	nelgelpuffer		
	750	μΙ	30% Acrylamid			
	50	μΙ	10% SDS			
	30	μΙ	10% APS			
	10	μI	TEM	ED		
Trenngelpuffer:	1,5	Μ	Tris/H	ICI pH 8,8		
Sammelgelpuffer:	0,5	Μ	Tris/H	ICI pH 6,8		
5 x SDS-Probenpuffer:		250	mМ	Tris/HCl pH 6,8		
		500	mМ	DTT		
		10	%	SDS		
		0,5	%	Bromphenolblau		
		50	%	Glycerol		

1 x SDS-Laufpuffer:	200	mМ	Glycin
	25	mМ	Tris
	0,1	%	SDS

2.2.2.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran wird auch als Western-Blotting bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Nass-Transfer mit dem Tank-Blotter "Criterion" (Biorad) auf eine PVDF-Membran (Millipore) durchgeführt. Dabei wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Gel in Transblot-Puffer äquilibriert. Das Gel und die Membran wurden zwischen Whatman-Papiere geschichtet, so dass durch die Stromrichtung die negativ geladenen Proteine auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer erfolgte bei 75V für 60 Minuten. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in 5% Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern.

Transblot-Puffer (1000ml):				14,4	g	Glycin	
			3	g	Tris		
				100	ml	Methanol	
Blockingpuffer: 5%		Milch	pulver(w/v) ir	ו 1 x TBST		
1 x TBST: 1 x		TBS-	TBS-Puffer				
	0,1	%	Iwee	n°20 (v/v)(50	erva Elektrophoresis GmbH)	
10 x TBS:	1,4	М	NaCl				
	25	mМ	KCI				
	250	mМ	Tris				
pH 7,4							

2.2.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nachweis von immobilisierten Proteinen

Die mit Hilfe von Western-Blotting auf eine PVDF-Membran immobilisierten Proteine können mittels Antikörper nachgewiesen werden (Immunoblot). Hierzu wurde die abgesättigte Membran mit dem primären, Proteinspezifischen Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend dreimal mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Da die primären Antikörper nicht Enzym-gekoppelt waren, wurde mit einem sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten (HRP, engl Horseradish Peroxidase) Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mit Hilfe des Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL) von Amersham Biosciences. Das emittierte Licht konnte dann mittels Autoradiographie unter Verwendung von Cronex Röntgenfilmen (Agfa) detektiert werden.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde zur Lokalisation von Proteinen innerhalb von Gewebeschnitten eingesetzt. Verwendet wurde der Petagen AccuMax A207(III) multiple tissue array (Biomol), welcher normales Pankreasgewebe und Gewebe aus Pankreas-Adenokarzinomen enthielt. Die Immunfärbung wurde mit dem Vectastain[®]ABC Kit durchgeführt. Für die Färbung wurden die Gewebe zunächst mit dem ungelabelten WNT5A-Antikörper und danach mit einem Komplex aus Avidin und einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. (ABC-Technik). Das verwendete Substrat Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) wird durch eine Peroxidase gespalten und es entsteht eine braune Farbgebung.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

• Herstellung von Nährmedien

Für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Tabelle 8) wurde kommerziell erworbenes Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet. Diesem Medium wurde 10% FCS und Normocin (50 mg/500ml Medium) zugefügt.

• Auftauen von Zellen

Zur Rekultivierung von Zellen, die in Kryogefäßen (Nalgene Labware) und 10% DMSO (v/v) in flüssigem Stickstoff gelagert waren, wurden die Zellen zunächst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in ein geeignetes Kultivierungsgefäß überführt und mit 0,2 ml Medium pro cm² bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel, um DMSO-Rückstände zu entfernen.

Subkultivierung von Zellen

Das Wachstum der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Kurz bevor die Zellen konfluent waren, d.h. die gesamte Fläche des Kulturgefäßes bedeckten, wurden sie durch Passagieren (Verdünnung und Überführung in neue Gefäße) subkultiviert. Zunächst wurden sie mit 1 x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, w/v, Biochrom AG) je nach Zelllinie 1 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen vollständig von der Gefäßoberfläche abgelöst hatten, wurde frisches serumhaltiges Kulturmedium zugegeben. Je nach Bedarf wurden die Zellen verdünnt und in neue Kultivierungsgefäße überführt.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Hämozytometer mit der Einteilung nach Neubauer eingesetzt. Vor der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Gefäßoberfläche abgelöst und in frisches Medium aufgenommen. Eine Probe der Zellsuspension wurde am oberen Rand des Deckglases, welches zuvor auf der Zählkammer positioniert wurde, aufgetragen. Nach dem Zählen der Zellen in den vier Eckquadraten, wurde der Mittelwert mit dem Faktor 1 x 10^4 multipliziert und man erhielt die Zellzahl, die in einem ml Zellsuspension enthalten ist.

Kryokonservierung

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurde ein Aliquot Zellsuspension in ein Kryogefäß gegeben. Als Frostschutzmittel wurde der Suspension 10% DMSO (v/v) beigemischt. Die Kryogefäße wurden anschließend über Nacht bei –80°C in einem Kryo-Container "Mr. Frosty" (Nalgene), welcher mit 100% 2-Propanol gefüllt war und somit eine Abkühlung von 1°C pro Minute gewährleistet, aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen bis zum Auftauen in einen Stickstoffaufbewahrungsbehälter überführt.

Herstellung und Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Herstellung der stabilen Zelllinie Panc-1 pBig2i/WNT5A, wurde das Transfast[™] zuvor klonierte Plasmid pBig2i/WNT5A mit der Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers in Panc-1 Zellen transfiziert. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen wurden die Zellen nach 24 Stunden in Selektionsmedium (DMEM/10% FCS/400µg Hygromycin pro ml) kultiviert und nach einigen Tagen positive Klone, welche den Vektor und das Resistenzgen stabil im Genom überexprimiert hatten, durch "picken" in 24-well-Platten vereinzelt und weiterkultiviert. Positive Klone wurden durch Western-Blot-Analysen nach Induktion der WNT5A-Expression durch Doxycylin (4µg/ml) getestet.

2.2.3.2 Transfektion von humanen Zelllinien

• Transfektion von siRNA (small interfering RNA)

Unter RNAi (RNA-Interferenz) versteht man einen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Expression von einzelnen Genen mit Hilfe von kleinen doppelsträngigen RNA-Molekülen hemmt. Diese RNA-Moleküle können entweder exogen zugegeben oder endogen erhalten werden. Die Aufnahme exogener, synthetischer siRNA-Moleküle in die Zelle erfolgt mit speziellen Reagenzien. Die kurzen RNA-Doppelstränge werden unter ATP-Verbrauch entwunden und in den RNA-induced-silencing-complex (RISC) eingebaut. Dieser Komplex kann nun an die Ziel-mRNA binden und diese degradieren. Endogen können diese siRNA-Moleküle aus dsRNA bzw. hairpin-RNA durch Prozessierung im sog. Dicer-Komplex gewonnen werden.



Abbildung 4: Struktur einer siRNA (A) und Mechanismus der RNAi (B) [http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:SiRNA_and_RNAI_german.png]

Die Transfektion synthetischer siRNAs (s. Tabelle 3) wurde mit Transmessenger[™] Transfektions-Reagenz (Qiagen) für Panc-1, MiaPaca2, PaTu-8988t und HT1080 Zellen bzw. mit XtremeGene (Roche Applied

Biosystems) für ImimPC1 Zellen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Transfektionseffizienz zu verbessern, wurde die Transfektion nach 24 h wiederholt.

Transfektion von DNA

Die transiente Transfektion von DNA-Konstrukten (s. 2.1.6) wurde mit Hilfe der Transfast[™] Transfektions-Reagenz (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Mit Hilfe von Reportergen-Assays konnte die Transkriptionsaktivität der zuvor transfizierten Promotor-Konstrukte (Tabelle 1) untersucht werden. Zusätzlich zu den Promotor-Konstrukten wurde 1 U β -Galaktosidase (Sigma-Aldrich) als Transfektionskontrolle in die Zellen transfiziert. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 200 µl 1 x Reporter-Lysispuffer (Promega) im 24-well für ca. 30 Minuten bei –20°C lysiert. Je zweimal 20 µl des Lysats wurden zur Luciferase-und β -Galaktosidase-Messung verwendet.

• Luciferase-Assay

Bei diesem Assay diente das auf den Konstrukten enthaltene Luciferase-Gen als Reporter. Das in dieser Arbeit eingesetzte Enzym (firefly – Leuchtkäfer-Luciferase) katalysiert in Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ die Umwandlung von D-Luciferin in Oxyluciferin, wodurch Licht mit einer Wellenlänge von 550 bis 570 nm emittiert wird (Biolumineszenz).

Die Aktivität der Luciferase wurde in einer Doppelbestimmung gemessen. Hierzu wurde 20 µl des Lysats in eine spezielle 96-well-Platte pipettiert. Die automatische Injektion von 100 µl Luciferase-Reagenz (P.J.K GmbH) erfolgte im Luminometer und die Biolumineszenz wurde über einen Zeitraum von 10 s bestimmt. Die Biolumineszenz verhält sich hierbei proportional zur Luciferase-Aktivität.

• β-Galaktosidase-Assay

Als interne Kontrolle der Transfektion wurde hier β -Galaktosidase verwendet und als Protein in die Zellen transfiziert. Die Aktivität des Enzyms konnte kolorimetrisch durch die Umsetzung von o-Nitrophenyl- β -D-galactosid (oNPG) durch die β -Galaktosidase zu Galactose und o-Nitrophenol bestimmt werden. oNPG ist in wässrigen Lösungen farblos, während o-Nitrophenol gelb gefärbt ist und ein Absorptionsmaximum bei 420 nm aufweist. Liegt oNPG im Überschuss vor, so ist die Menge an gebildetem o-Nitrophenol proportional zur Menge an β -Galaktosidase im Ansatz. Mittels der β -Galaktosidase-Werte ließen sich die Luciferase-Werte, die von der Transfektionseffizienz abhängig waren, normieren.

Zur Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde 20 µl Lysat zusammen mit 200 µl Z-Puffer in ein Eppendorfgefäß gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 420 nm photometrisch bestimmt.

Z-Puffer:	2,5	ml	oNPG (4 mg/ml)
	750	μΙ	1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,4
	10	μΙ	1 M MgCl ₂
	40	μΙ	β-Mercaptoethanol
	ad 10) ml A	. dest.

• Korrektur der Luciferase-Werte

Um die Transkriptionseffizienz zu berücksichtigen, wurde der Mittelwert für die Luciferase-Aktivität durch den entsprechenden Mittelwert der β-Galaktosidase-Aktivität geteilt. Dieser Wert liefert die relative Luciferase-Aktivität.

2.2.5 CaMKII-Assay

Mit dem CaMKII (calmodulin-dependent kinase II) Assay Kit (Upstate) konnte die Phosphotransferase Aktivität der CaM Kinase II bestimmt werden. Der Kit basierte auf der Phosphorylierung eines spezifischen Substrates durch den Transfer von [³²P]ATP durch die CaM Kinase II. Das phosphorylierte Substrat wurde anschließend durch ein P81-Phosphocellulose Membran wieder vom [³²P]ATP getrennt und die Menge an [³²P]ATP mit Hilfe eines Scintillationszählers quantifiziert. Die gemessene Aktivität verhält sich proportional zur CaM Kinase Aktivität.

2.2.6 <u>Thymidin-Proliferations-Assay</u>

Die Proliferationsrate von eukaryotischen Zellen kann durch den Einbau von ³Hmarkiertem Thymidin in sich replizierende DNA bestimmt werden. Hierzu wurden 5x10⁴ transfizierte Zellen pro well einer 24-well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden pro well 5µCi ³H-Thymidin zu den Zellen gegeben und für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit eiskalter 5%iger Trichloressigsäure (TCA) behandelt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und mit 1 M NaOH lysiert. Die Radioaktivität wurde anschließend in einem Liquid Scintillation Counter (Pharmacia) quantifiziert.

2.2.7 Migrations-/Invasionsassays

2.2.7.1 Boyden-Kammer Migrations-/Invasions-Assay

Um die Migrations-/Invasionsrate verschiedener Zelllinien zu bestimmen, wurden modifizierte Boyden-Kammer Migrations-/Invasionsinserts verwendet. Während die Migrationsinserts aus einer Membran mit einer Porengröße von 8 µm (BD Falcon) bestehen, sind die Invasionsinserts noch zusätzlich mit einer Matrix aus

Matrigel beschichtet. Für den Assay wurden $5x10^4$ Zellen in serumfreien Medium in die Inserts pipettiert. An die Insertunterseite wurden 750 µl serumhaltiges Medium zugegeben um die Chemotaxis der Zellen zu stimulieren. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 8 – 24 h wurde das Medium im Insert vorsichtig abgesaugt und eine Messung der migrierten/invadierten Zellen erfolgte entweder durch eine Kristallviolettfärbung oder durch die CellTiterGlo Reagenz.

Für die Kristallviolettfärbung wurden die Inserts für 10 Minuten in eine Kristallviolett-Färbelösung gehängt. Die an der Insertinnenseite verbliebenen Zellen wurden ausgewischt und die angefärbten, migrierten/invadierte Zellen an der Insertunterseite wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) gezählt.

Alternativ wurden die Zellen an der Insertinnenseite ausgewischt und die Insertunterseite für 15 Minuten in 100 µl CellTiterGlo (Promega) inkubiert. Das CellTiterGlo Reagenz ermittelt die Anzahl der migrierten /invadierten Zellen durch eine Quantifizierung des ATP-Gehalts, welcher zur Zahl metabolisch aktiver Zellen proportional ist. Die Zahl der migrierten/invadierten Zellen wurde auf die Zahl proliferierender Zellen, welche gleichzeitig bestimmt wurden, normalisiert.

Wurden die Zellen transient mit Expressions-Plasmiden transfiziert, so erfolgte die Auswertung über eine X-Gal-Färbung. Hierzu wurde zusätzlich ein lacZ-Plasmid transfiziert und erfolgreich transfizierte Zellen wurden nach der Migration/Invasion mittels einer X-Gal-Färbung selektiert. Hierzu wurden die Inserts zweimal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 1,25% Glutaraldehyd für 5 Minuten an der Membran fixiert. Nach einem wiederholten Waschschritt wurden die Inserts in X-Gal-Färbelösung bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Inserts ausgewischt und migrierte/invadierte, transfizierte Zellen wurden durch Zählung blau gefärbter Zellen unter dem Lichtmikroskop ermittelt. In diesem Fall wurde die Zahl migrierter/invadierter Zellen auf die Gesamtzahl transfizierter Zellen normalisiert.

Kristallviolett-Färbelösung: 0,2 % Kristallviolett 20 % Methanol

X-Gal-Färbelösung:			500	μΙ	1 M Tris/HCl pH 7,5
			500	μΙ	Ferriferrocyanide
			30	μΙ	5 M NaCl
			10	μΙ	1 M MgCl
			250	μΙ	X-Gal
			8710	μΙ	A. dest.
Ferriferrocyanide (5 ml):			210	mg	Potassiumferrocyanide
			104	mg	Potassiumferricyanide
X-Gal :	100	mg	X-Gal	(Sigm	a-Aldrich)
	5	ml	Dimet	hylforn	namid

2.2.7.2 Time-Lapse Mikroskopie

Um migrierende Zellen über einen bestimmten Zeitabschnitt zu beobachten, wurde eine sog. Time-Lapse Mikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden 1x10⁵ Zellen auf ein Deckglas gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ für 12 h inkubiert, damit sich die Zellen an das Deckglas anheften konnten. Anschließend wurden die Zellen in serumhaltigem Medium mit Hilfe eines Olympus IX-71 Mikroskop über einen Zeitraum von 20 h beobachtet. In diesem Zeitraum wurde alle 15 Minuten ein Bild der Zellen erstellt. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde ermittelt, indem die Distanz, welche die Zellkerne zurücklegten, von 25 Zellen mittels der ImageJ Software (http://rsb.info.nih.gov/ij/) berechnet wurde.

2.2.8 Apoptose-Assays

2.2.8.1 Analyse der DNA-Fragmentierung

• FACS-Analyse der DNA-Fragmentierung

Die FACS ("Fluorescence activated cell sorting")-Analyse ermöglicht die Detektion von Zellen oder deren DNA-Gehalt mittels Fluoreszenzmarkierung. Hierbei werden markierte Zellen mit Laserlicht angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Zudem gestatten Beugung und Streuung des Laserlichts Aufschluss über Größe und Granularität der Zellen. Verwendet wurde ein FACScan/FACScalibur (Becton Dickinson) und Propidiumjodid als DNA-Farbstoff.

Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte nach der von Nicoletti beschriebenen Methode [Nicoletti et al. 1991]. Hierzu wurden die transfizierten und mit TRAIL/TNFSF10 (R&D Systems) behandelten Zellen mit Trypsin aus den Kultivierungsbehältern abgelöst, bei 1800 rpm abzentrifugiert und mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 200µl Nicoletti-Puffer aufgenommen und für 6 h bei 4°C inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Bestimmung der M1-Phase ermittelt.

Nicoletti-Puffer:	47,5	ml	0,1% Trinatriumcitrat-Dihydrat
	47,5	ml	0,4% Triton-X 100
	5	ml	Propidiumjodid (50µg/ml)

• Cell Death Detection Elisa^{PLUS} (Roche Diagnostics)

Mit Hilfe dieses Kits kann DNA-Fragmentierung durch Anti-Histon-Antikörper detektiert werden. Hierzu wird das Zelllysat zusammen mit einem Anti-Histon-Biotin-Antikörper und einem Anti-DNA-POD-Antikörper (Peroxidase-gekoppelter Antikörper) auf eine Streptavidin-beschichtete Platte gegeben. Während einer zweistündigen Inkubation bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der fragmentierten DNA und gleichzeitig über das gekoppelte Biotin an die Streptatavidin-beschichtete Platte. Der Anti-DNA-POD-Antikörper bindet nun an die DNA-Komponente dieses Komplexes. Nach mehrmaligem Waschen wird ein Substrat zu diesem Komplex pipettiert. Die gekoppelte Peroxidase ist nun in der Lage das Substrat (ABTS) zu spalten und es kommt zu einer Färbung der Lösung. Die Apoptoserate kann nun photometrisch quantifiziert werden.

• DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (Promega)

Dieser Assay detektiert DNA-Fragmentierung apoptotischer Zellen nach dem TUNEL Prinzip (TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling). Hierbei werden 3'OH-Enden der DNA mit Fluorescin-12-dUTP mit Hilfe der Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) markiert. Die fluoreszierende, markierte DNA kann nun am Mikroskop quantifiziert werden.

2.2.8.2 Analyse der Caspase-Aktivitäten

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Caspase 3 und Caspase 7 wurde der Caspase-Glo[®]3/7-Assay (Promega) verwendet. Dieser Assay beinhaltet ein luminogenes Substrat dieser beiden Caspasen. Nach einer Lyse der Zellen spalten Caspase 3 und 7 diese Substrat und das entstehende Signal kann im Luminometer gemessen werden. Die Biolumineszenz verhält sich hierbei proportional zur Aktivität der Caspasen.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation von WNT5A durch den Transkriptionsfaktor CUTL1

In Vorarbeiten konnten potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors CUTL1, welche eventuell die Effekte von CUTL1 auf Migration und Invasion übermitteln könnten, durch Microarray-Analysen der murinen Zellinie NIH3T3 identifiziert werden. Unter anderem zeigte sich hier, dass die mRNA-Expression von WNT5A, einem Mitglied der WNT-Glykoproteinfamilie, durch den Transkriptionsfaktor CUTL1 stark reguliert wurde.

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Expressionsprofilanalyse wurde die Regulation von WNT5A in den verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, ImimPC-1, MiaPaCa-2 und der Fibrosarkomzelllinie HT1080 zunächst auf RNAund Proteinebene untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit siRNA für CUTL1 transfiziert und RNA isoliert bzw. Gesamtzellysat hergestellt. Anschließend wurde die Expression der WNT5A mRNA mittels quantitativer RT-PCR (Abb.5A) bzw. die Expression des WNT5A-Proteins durch Western-Blot-Analysen (Abb.5B) in den einzelnen Proben analysiert.





Abbildung 5: (A) Quantitative RT-PCR von verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien mit transienter Repression von CUTL1 durch RNAi. RNA wurde aus Zellen, welche mit CUTL1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert waren, isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer quantitativen RT-PCR wurde die Expression von WNT5A ermittelt. Eine Normalisierung erfolgte auf die Expression von RPLP0. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Western-Blot-Analyse der WNT5A Expression nach Repression von CUTL1. Im Gesamtzelllysat aus Zellen, in denen CUTL1 durch RNAi reprimiert war, wurde die WNT5A Expression und die CUTL1 Expression mit Hilfe spezifischer Antikörper kontrolliert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

Es konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werde, dass eine transiente Repression von CUTL1 mittels RNAi zu einer verminderten Expression von WNT5A mRNA und Protein in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, ImimPC-1und MiaPaca-2 und der Fibrosarkomzelllinie HT1080 führt.

Des weiteren wurde CUTL1 durch die Transfektion eines Expressionsplasmides, welches ein C-terminales Fragment von CUTL1 (Aminosäuren 831-1336) enthielt, in Panc-1 und HT1080 Zellen überexprimiert. Dieses C-terminale Fragment des Transkriptionsfaktors stellt aktive Form des CUTL1-Proteins eine dar. Physiologischerweise wird CUTL1 durch die Protease Cathepsin L in zwei Fragmente gespalten, von denen das C-terminale Fragment die meiste transkriptionelle Aktivität aufweist. Eine Überexpression dieses aktiven CUTL1 hatte eine gesteigerte WNT5A-Expression in Panc-1 und HT1080 Zellen zur Folge (Abb.6).



Abbildung 6 (vorherige Seite): Überexpression von CUTL1 führt zu gesteigerter WNT5A-Expression. Panc-1 und HT1080 Zellen wurden transient mit dem Expressionsplasmid eines C-terminalen Fragments von CUTL1 (Aminosäuren 831-1336) oder mit einem Kontrollvektor transfiziert und nach 24 h geerntet. WNT5A wurde mittels Western-Blot in den Zelllysaten detektiert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

Die transkriptionelle Regulation von WNT5A durch CUTL1 wurde durch Luciferase-Reporter-Assays analysiert. Hierzu wurde ein Luciferase-Konstrukt (Tabelle 1) das die potentiellen WNT5A-Promotorregion umfasste, verwendet, d.h. die 2 kb Region vor dem Transkriptionsstartpunkt von WNT5A. Es zeigte sich, dass eine Expression von CUTL1 zu einer Aktivierung des WNT5A-Promotors führt (Abb.7). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CUTL1 als auch das gespaltene, aktive 110 kDa CUTL1-Fragment in Panc-1 Zellen nach Überexpression vorhanden war.



Abbildung 7 (vorherige Seite): Überexpression von CUTL1 führt zu einer Aktivierung des WNT5A-Promotors. Panc-1 Zellen wurden mit dem full-length CUTL1-Plasmid, was zu einer Expression von CUTL1 und der aktiveren Form p110 führt, oder einem Kontrollvektor, dem pGL3-WNT5A-Konstrukt, und dem ß-Galaktosidase-Protein transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Aktivierung des WNT5A-Promotors durch eine Luciferase-Messung bestimmt. Die Luciferase-Wert wurden auf den ß-Galaktosidase-Level der Zellen normalisiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2 CUTL1 vermittelt seine Effekte auf Migration und Invasion über WNT5A

Der Transkriptionsfaktor CUTL1 ist ein Mediator der TGFß-induzierten Zell-Migration und Invasion. Um nun herauszufinden, ob CUTL1 seine Effekte auf das Migrations- und Invasionsverhalten über sein Zielgen WNT5A vermittelt, wurden Migrations- und Invasions-Assays mit Panc-1, MiaPaca-2, ImimPC-1 und HT1080 Zellen durchgeführt.

3.2.1 <u>WNT5A beeinflusst das Migrations- und Invasionsverhalten</u> <u>verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien</u>

Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine transiente Repression von WNT5A mittels RNAi zu einer deutlich reduzierten Migrationsrate aller Zelllinien in Boyden-Kammer-Experimenten führt (Abb.8). Die Zahl der migrierenden Zellen wurde hier auf die Anzahl proliferierender Zellen in dem betrachteten Zeitraum normalisiert, um gegebenenfalls proliferationsbedingte Artefakte auszuschließen.



Abbildung 8: Die Repression von WNT5A führt zu einer verminderten Migration. Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen wurden transient mit hWNT5A_1 siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert und die Migration nach 4h (HT1080) bzw. 8h in Boyden-Kammer-Assays gemessen. Die Anzahl migrierender Zellen wurde mit Hilfe der CellTiter-Glo[®] Reagenz bestimmt und auf die Anzahl proliferierender Zellen normalisiert. Die Repression von WNT5A wurde mittels Western-Blot analysiert. Gleiche Ergebnisse wurden mit hWNT5A_2 siRNA erzielt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zusätzlich zu den Boyden-Kammer-Assays wurden Time-Lapse Mikroskopie Versuche mit HT1080 Zellen durchgeführt. Auch hier wurde WNT5A mittels RNAi reprimiert und die Zellen über einen Zeitraum von 20 h mit einem Olympus IX-71 Mikroskop im 15-Minuten-Intervall beobachtet. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde mittels ImageJ Software ermittelt (Abb.9).



Abbildung 9: Time-Lapse Mikroskopie zeigt eine geringere Migration nach Repression von WNT5a. HT1080 Zellen wurden mit hWNT5a_1 siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert und die Migration über 20 h unter serumhaltigen Bedingungen verfolgt. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde von 25 Zellen bestimmt und gemittelt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Effekte von WNT5A auf die Invasion, d.h. auf die Bewegung durch eine dreidimensionale Matrix, wurden durch Boyden-Chamber-Invasionsassays mit Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen ermittelt. Die Invasion durch eine mit 30µm Matrigel beschichtete Membran mit einer Porengröße von 8 µm zeigte eine um bis zu 70% verminderte Invasionsrate von Panc-1, ImimPC-1 und HT1080 Zellen nach Transfektion mit hWNT5A_1 siRNA (Abb.10). MiaPaca-2 Zellen zeigten, im Gegensatz zu den Migrationsassays, nach Repression von WNT5A keine signifikanten Unterschiede im Invasionsverhalten (Abb.10).



Abbildung 10: Repression von WNT5A führt zu einer verminderten Invasionsrate. Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen wurden transient mit hWNT5A_1 siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert und die Invasion nach 8 h (Panc-1, MiaPaca-2, HT1080) bzw. 12h (ImimPC-1) quantifiziert. Die Anzahl invasiver Zellen wurde mittels CellTiter-Glo[®] Reagenz bestimmt und auf die Anzahl proliferierender Zellen im betrachteten Zeitraum normalisiert. Gleich Ergebnisse wurden mit hWNT5A_2 siRNA erzielt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um unspezifische Off-target Effekte, die durch RNA interference gelegentlich beobachtet werden, auszuschließen, wurden weitere Migrations- und Invasionsassays mit Panc-1 Zellen, welche mit einem tetracyclin-induzierbaren WNT5A Expressionsplasmid (pBig2i/WNT5A) transfiziert waren, durchgeführt. Nach der durch Doxycylin induzierten WNT5A-Expression zeigte sich eine deutlich gesteigerte Migration und Invasion der Panc-1 Zellen (Abb.11A).

Des weiteren wurde WNT5A, welches als sezernierter Ligand fungiert, exogen als rekombinantes Protein in Boyden-Kammer-Assays eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine gesteigerte Migrationsrate in Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen (Abb.11B).



Abbildung 11: WNT5A steigert die Migrations- und Invasionsrate. (A) Panc-1 Zellen wurden stabil mit dem pBig2i/WNT5A Konstrukt transfiziert und für 24 h mit Doxycyclin bzw. DMSO behandelt. Die gesteigerte WNT5A Expression wurde mittels Western-Blot analysiert. Migration bzw. Invasion wurden über eine Zeitspanne von 6h bzw. 8 h quantifiziert. Die Anzahl migrierender bzw. invasiver Zellen wurden mittels CellTiter-Glo[®] gemessen und auf die Zahl proliferierender Zellen normalisiert. **(B)** Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen wurden mit 500ng/ml WNT5A Protein behandelt und die Migrationsrate nach 6 h(HT1080) bzw. 12 h ermittelt. Die Auswertung erfolgte auch hier mittels CellTiter-Glo[®]. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

So konnte durch RNAi Experimente, Überexpressionsexperimente und exogene Zugabe von WNT5A gezeigt werden, dass WNT5A einen deutlichen Effekt auf das Migrations- und Invasionsverhalten verschiedener Zelllinien besitzt.

3.2.2 <u>WNT5A vermittelt die von CUTL1 induzierten Migrations- und</u> <u>Invasionseffekte</u>

Um die Relevanz von WNT5A in der durch CUTL1 vermittelten Migration und Invasion zu bestimmen, wurde der Effekt des Knock-Downs von WNT5A in Abhängigkeit von der CUTL1-Expression untersucht. Hierzu wurden Panc-1 Zellen, die eine stabile Repression von CUTL1 aufwiesen, mit WNT5A siRNA transfiziert. Es zeigte sich, dass eine transiente Repression von WNT5A sowohl die Migration (Abb.12A) als auch Invasion (Abb.12B) von Panc-1 Zellen im ähnlichen Maße wie eine Repression von CUTL1 beeinflusst. Wurde die Expression beider Proteine gehemmt, zeigte sich ein zusätzlicher Effekt auf Migration bzw. Invasion.



Abbildung 12: WNT5A fungiert als Mediator der CUTL1-vermittelten Migration und Invasion. Panc-1 Zellen mit stabiler Repression von CUTL1 durch shCUTL1 bzw. Kontrollzellen (shKontrolle) wurden transient mit hWNT5A_1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Die Migration (A) bzw. Invasion (B) wurde durch Boyden-Chamber-Assays ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch eine Zellzählung der fixierten und mit Kristallviolett angefärbten Zellen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Des weiteren wurden Panc-1 Zellen mit stabiler CUTL1 Repression mit pBig2i/WNT5A transfiziert und die WNT5A Expression mit Doxycylin induziert. Eine Expression von WNT5A konnte den Effekt von CUTL1 auf die Migration aufheben (Abb.13), wodurch gezeigt wurde, dass WNT5A als Effektor der durch CUTL1 vermittelten Migration und Invasion wirkt.



Abbildung 13: Der durch shCUTL1 vermittelte Effekt auf Migration wird durch die Expression von WNT5A aufgehoben. Panc-1 Zellen mit stabiler Repression con CUTL1 mit shCUTL1 bzw. Kontrollzellen wurden mit dem WNT5A Expressionsplasmid pBig2i/WNT5A transfiziert und die Expression von WNT5A durch Doxycyclin induziert. Um transfizierte Zellen zu selektieren, wurde zusätzlich ein lacZ-Plasmid cotransfizierte. Die Migration wurde durch Boyden-Kammer-Assays ermittelt, wobei transfizierte und migrierte Zellen mittels X-Gal-Färbung gezählt wurden. Die Zahl migrierter Zellen wurde auf die Anzahl proliferierender, transfizierte Zellen normalisiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2.3 <u>WNT5A beeinflusst die Proliferationsrate verschiedener</u> <u>Pankreaskarzinomzellen</u>

Neben den Effekten des Transkriptionsfaktors CUTL1 auf die Zellmotiliät verschiedener Zelllinien besitzt CUTL1 auch Einfluss auf die Proliferation. Um herauszufinden, ob das Zielgen WNT5A ebenfalls die Proliferation beeinflusst, wurden Thymidin-Proliferationsassays durchgeführt. Hierbei wurde WNT5A durch RNAi reprimiert und der Einbau von ³[H]-Thymidin in die DNA gemessen (Abb.14). Es zeigte sich, dass eine Repression von WNT5A die Proliferationsrate von Panc-1, MiaPaca-2 und HT1080 Zellen reduziert, wohingegen die Proliferation der ImimPC-1 Zellen weitgehend unbeeinflusst blieb.



Abbildung 14: Die Repression von WNT5A reduziert die Proliferationsrate. Panc-1, ImimPC-1, MiaPaca-2 und HT1080 wurden transient mit hWNT5A_1 siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ³[H]-Thymidin quantifiziert. Gleiche Resultate wurden mit hWNT5A_2 siRNA erzielt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.3 WNT5A wird durch TGFß über CUTL1 reguliert, ist ein Bestandteil der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und beeinflusst den ß-Catenin-abhängigen Signalweg

3.3.1 Regulation durch TGFß

Es ist bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor CUTL1 durch TGFß reguliert wir. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass WNT5A ein Zielgen von CUTL1 ist und eine bedeutende Rolle in der Regulation von Migration und Invasion spielt, stellte sich nun die Frage, ob WNT5A auch durch TGFß reguliert wird und ob diese Regulation über CUTL1 stattfindet.

Tatsächlich konnte ein erhöhter WNT5A Protein Level nach Stimulation mit TGFß nachgewiesen werden (Abb. 15). Nach einer Repression von CUTL1 konnte dieser Effekt von TGFß auf WNT5A nicht mehr gezeigt werden, was auf eine Regulation von WNT5A durch TGFß über CUTL1 hinweist.



Abbildung 15: WNT5A wird von TGFß über CUTL1 reguliert. Panc-1 Zellen wurden transient mit CUTL1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und 18 h mit TGFß (10ng/ml) behandelt. Der WNT5A Protein Level wurde mittels Western-Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

3.3.2 WNT5A ist an der Regulation von EMT Markerproteinen beteiligt

TGFß steigert die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT), welche für eine Tumorprogression charakteristisch ist und mit erhöhter Migration und Tumorinvasivität in Verbindung steht. Da bereits WNT5A als Effektor von TGFß und des Transkriptionsfaktors CUTL1 identifiziert wurde, wurden nun einige EMT-Markerproteine, wie E-Cadherin und Vimentin, untersucht, um eine mögliche Beteiligung von WNT5A bei der Modulation des EMT nachzuweisen. Als Zellmodell wurden Panc-1 Zellen, die als EMT Modell geeignet sind, verwendet. Eine Repression von WNT5A führte zu einer gesteigerten Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und zu einer verminderten Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (Abb.16). Der promigratorische Effekt von WNT5A ist somit assoziiert mit einer EMT-typischen Veränderung der Markerprotein E-Cadherin und Vimentin.



Abbildung 16: WNT5A spielt bei der Regulation von EMT-Markerproteinen eine Rolle. Panc-1 Zellen wurden transient mit WNT5A siRNA bzw. mit Kontroll siRNA transfiziert und die Expression der EMT-Markerproteine E-Cadherin und Vimentin mittels Western-Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

3.3.3 Regulation über den ß-Catenin-abhängigen Signalweg

WNT5A kann seine Effekte je nach Rezeptorkontext sowohl über einen Kalziumabhängigen, nicht-kanonischen als auch über den ß-Catenin-abhängigen, kanonischen Signalweg vermitteln. Hierbei bindet das WNT-Protein an einen Frizzled Rezeptor, ß-Catenin wird stabilisiert, welches im Zellkern einen Komplex mit TCF/LEF bildet und spezifische Zielgene aktiviert.

3.3.3.1 Aktivierung des TCF-Bindungselements

In Panc-1 Zellen konnte nach Zugabe eines rekombinanten WNT5A-Proteins eine deutliche Steigerung der Bindung an ein TCF-Bindungselement im Reporter-Assay beobachtet werden (Abb.17A). Des weiteren konnte durch eine Transfektion von pBig2i/WNT5A und einer Induktion der WNT5A Expression durch Doxycyclin eine erhöhte Reporteraktivität gezeigt werden. Durch Kotransfektion eines dominant-negativen Lef1-Konstrukts konnte diese Aktivität wieder aufgehoben werden (Abb.17B). Die gesteigerte TCF/LEF-abhängige Reporteraktivität war zwar signifikant, aber ein ausgeprägter Effekt, wie nach einer Aktivierung mit einem Lef1-Konstrukt, konnte nicht erzielt werden.



Abbildung 17: WNT5a erhöht die TCF/LEF-abhängige Reporter-Aktivität und kann durch dominant-negatives Lef1 gehemmt werden. (A) Panc-1 Zellen wurden mit TOPflash bzw. FOPflash Plasmiden und ß-Galaktosidase transfiziert und mit 500ng/ml rekombinantem WNT5A Protein für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Aktivierung des TCF-Bindeelements im Reporter-Assay quantifiziert. (B) Panc-1 Zellen wurden mit pBig2i/WNT5A, TOPflash, Lef1 bzw. dominant-negativem Lef1 und ß-Galactosidase transfiziert und die WNT5A Expression durch Doxycyclin induziert. Nach 24 h wurde die TCF/LEF-abhängige Reporter-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Werte wurden auf die ß-Galaktosidase-Werte normalisiert.

Äquivalente Ergebnisse konnten in Panc-1, ImimPC1-1 und MiaPaca-2 erzielt werden, in denen WNT5a mittels RNAi gehemmt wurde (Abb.18).



Abbildung 18: Repression von WNT5A vermindert die TCF/LEF-abhängige Reporter-Aktivität. Panc-1, ImimPC-1 und MiaPaca-2 wurden transient mit WNT5A siRNA bzw. Kontroll siRNA, TOPflash und ß-Galaktosidase transfiziert. Die Luciferase-Werte wurden nach 24 h bestimmt und auf ß-Galaktosidase-Werte normalisiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.3.3.2 Translokation von ß-Catenin

Um die Hinweise auf die Beteiligung kanonischer WNT-Signalwege zu untermauern, wurde zusätzlich die Translokation und Stabilisierung von ß-Catenin untersucht. Hierzu wurde in Panc-1, ImimPC-1 und MiaPaca-2 die Expression von WNT5A mittels RNAi gehemmt und nukleäre Extrakte isoliert. Es zeigte sich ein deutlich verminderter ß-Catenin Level im Nukleus nach Repression von WNT5A (Abb.19A). Des weiteren konnte nach Behandlung von Panc-1 Zellen mit rekombinantem WNT5A Protein ein gesteigerter Influx von ß-Catenin in den Kern beobachtet werden (Abb.19B). Ein veränderter cytosolischer ß-Catenin Spiegel zeigte sich nicht.



Abbildung 19: (A) Repression von WNT5A führt zu verminderten ß-Catenin Level im Zellkern. Panc-1, ImimPC-1 und MiaPaca-2 wurden transient mit WNT5A siRNA bzw Kontroll siRNA transfiziert und der ß-Catenin Level aus nukleären Extrakten bestimmt. Als positive Kontrolle des kanonischen Signalweges dienten nukleäre Extrakte aus LiCl (10nM) behandelten Panc-1 Zellen. (B) WNT5A erhöht den ß-Catenin Level im Zellkern. Panc-1 Zellen wurden für 12 h in serumfreien Medium mit 500ng/ml rekombinantem WNT5A Protein behandelt und ß-Catenin aus nukleären und cytosolischen Extrakten mittels Western-Blot analysiert. Als nukleäre Ladekontrolle diente Lamin A/C.

3.3.3.3 Phosphorylierung der GSK3beta

LiCl bewirkt die Phosphorylierung von GSK3ß und wirkt so als GSK3ß-Inhibitor. Dadurch können Substrate der GSK3ß, wie ß-Catenin und Axin, in der WNT-Signalkaskade nicht mehr phosphoryliert werden und eine Signalweiterleitung bzw. Translokation von ß-Catenin kann nicht mehr stattfinden. Um zu untersuchen, ob WNT5A Einfluss auf die Phosphorylierung der GSK3ß besitzt, wurden Panc-1 Zellen mit WNT5A siRNA transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an LiCl behandelt. Nach einer Repression von WNT5A konnte eine verstärkte Phosphorylierung der GSK3beta an Serin 9, welche durch LiCl induziert wird, kaum mehr beobachtet werden (Abb.20). Dieser Einfluss von WNT5A an der Phosphorylierung von GSK3 unterstützt zusätzlich die Signalweiterleitung von WNT5A über die kanonischen Signalkaskade.



Abbildung 20: Repression von WNT5A inhibiert eine LiCI-induzierte Phosphorylierung von GSK3beta. Panc-1 Zellen wurden transient mit hWNT5A_1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und der kanonische Signalweg durch eine Behandlung mit 10nm bzw. 30nm LiCI aktiviert. Die Phosphorylierung von GSK3beta an Serin 9 sowie Gesamt-GSK3 wurden durch spezifische Antikörper detektier. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

3.3.3.4 Phosphorylierung der Protein Kinase C

Die PKCs spielen eine wichtige Rolle bei dem durch WNT-Proteine aktivierten nicht-kanonischem Signalweg. Um Effekte von WNT5A auf den Kalziumabhängigen nicht-kanonischen Signalweg auszuschließen, wurde die Phosphorylierung verschiedener PKCs mittels Western-Blot analysiert. Es wurden unter anderem Antikörper für phospho-PKCalpha/beta (THR638/641), phospho-PKC(pan)(betallSer660), phospho-PKCdelta (Thr505), phospho-PKCdelta phosphoPKD/PKC (Ser744/748), phospho-PKD/PKC (Ser643), (Ser916), phospho-PKCtheta (Thr538) phosphoPKCzeta/lambda (Thr410/403) und verwendet. Nach Repression von WNT5A konnten keine Unterschiede in der Phosphorylierung der verschiedenen PKCs in Panc-1 und ImimPC-1 ermittelt werden (nur Ausschnitte in Abb.21 dargestellt).



Abbildung 21: WNT5A hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung verschiedener PKCs. Panc-1 und ImimPC1 wurden mit WNT5A siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und eine Repression von WNT5A und Phosphorylierung von PKCalpha/beta und PKC(pan) wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

3.3.3.5 Aktivierung der CaM Kinase II

Die Calmodulin-abhängige Protein Kinase II ist wie die PKCs ein wichtiger Bestandteil des nicht-kanonischen Signalweges. Die Aktivität dieser Kinase wurde radioaktiv nach Repression von WNT5A mittels RNAi bestimmt. Es zeigten sich zwar nach der Transfektion leichte Unterschiede in der Kinase-Aktivität, die jedoch nicht signifikant waren (Abb.22). Daraus lässt sich schließen, dass der nichtkanonische Signalweg keine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von WNT5A im Pankreaskarzinomzellen spielt.



Abbildung 22: WNT5A beeinflusst die Aktivität der CaM Kinase II nicht signifikant. Panc-1 Zellen wurden transient mit WNT5A siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Die Aktivität der CaM Kinase II wurde mit Hilfe des CaM Kinase II Assay Kits radioaktiv nach Angaben des Hersteller quantifiziert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhändige Experimente.

3.4 WNT5A ist während der Karzinogenese im Pankreas und im Pankreaskarzinom stark exprimiert

3.4.1 Expression von WNT5A in verschiedenen PanIN Läsionen

Die bisherigen Untersuchungen belegten, dass eine Repression von WNT5A zu einer reduzierten Proliferationsrate, Motilität und Invasivität und eine Expression von WNT5A zu einer verstärkten Proliferationsrate, Motilität und Invasivität führt. Nun wurde die physiologische Relevanz von WNT5A in der Tumorprogression untersucht, indem die Expression von WNT5A in verschiedenen Gewebeproben und in Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) ermittelt wurde. Diese PanIN Läsionen sind Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms, die in drei Grade (Ia, Ib, II und III) eingeteilt werden. Die unterschiedlichen Grade werden durch nukleäre Abnormalitäten und veränderte epitheliale Strukturen charakterisiert.

Aus 25 mikrodissoziierten PanIN Läsionen der Grade I-III, Tumorzellverbänden invasiver Adenokarzinome und normalen duktalen Zellen wurde RNA isoliert und die WNT5A Expression mittels quantitativer real-time PCR quantifiziert. In den PanIN Läsionen der Grade II und III konnte eine erhöhte WNT5A Expression aufgezeigt werden, die in etwa einen gleichen Level wie im Adenokarzinom

(PDAC) erreichte (Abb.23). PanIN Läsionen des Stadiums I hingegen, wiesen keine erhöhte WNT5A Expression auf.



Abbildung 23: Die WNT5A mRNA Expression ist in PanIN Läsionen hochreguliert. Die WNT5A mRNA Expression wurde aus RNA mikrodissoziierter PanIN Läsionen und invasivem Adenokarzinom amplifiziert und mittels Real-time PCR quantifiziert. Die Werte wurden auf die RPLP0 mRNA Expression normalisiert.

3.4.2 Expression von WNT5A im Pankreasgewebe

Um die Ergebnisse der PanIN Läsionen zu bekräftigen, wurden immunhistochemische Bilder in einem Petagen AccuMax A207(III) multiple tissue Array (Biomol) aus 16 unabhängigen Pankreaskarzinomgeweben und normalem Pankreasgewebe mit einem spezifischen WNT5A Antikörper erstellt. 13 der 16 Tumorgewebe wiesen eine deutlich stärkere WNT5A Expression auf im Vergleich zum Normalgewebe, welches nur eine geringfügige Färbung v.a. von duktalen Zellen und Inselzellen zeigte (Abb.24).

Anhand der Daten auf RNA- und Proteinebene kann eine wichtige Rolle von WNT5A bei der Tumorprogression und Invasivität vermutet werden.

Normales Pankreasgewebe



PDAC

Abbildung 24: WNT5A Protein ist im invasiven Pankreaskarzinom (PDAC) stark exprimiert. WNT5A wurde immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Bilder zeigen drei benigne Pankreasgewebe und drei Adenokarzinomgewebe und sind repräsentativ für 13/16 Karzinomgewebe und 16/16 anliegende Pankreasgewebe.

3.5 CUTL1 und WNT5A als antiapoptotisch wirkende Faktoren in Pankreaskarzinom-Zelllinien

Da CUTL1 in Vorarbeiten bereits als wichtiger Mediator der Tumorprogression identifiziert worden war, und hier bereits gezeigt wurde, dass WNT5A als CUTL1-Zielgen Mediator seiner Effekte auf die Invasivität ist, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Rolle von CUTL1 und WNT5A bei der Apoptoseresistenz von Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, die auch eine wichtige Voraussetzung für die Tumorprogression ist. Hierzu wurde die DNA-Fragmentierung und die Aktivität verschiedener Caspasen in Abhängigkeit von CUTL1, WNT5A und dem Tumor Necrosis Factor **R**elated **A**poptosis Inducing Ligand (TRAIL) analysiert.
3.5.1 Ermittlung der DNA-Fragmentierung

Die DNA-Fragmentierung ist ein wichtiger Bestandteil der TRAIL-induzierten Apoptose. Diese Fragmentierung kann z.B. durch durchflusszytometrische Analysen, Spaltung des Caspase-Substrates Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), calorimetrisch mittels des CellDeath Detection Eliza^{PLUS} Kits oder fluorimetrisch in einem TUNEL-Assay quantifiziert werden.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde CUTL1 bzw. WNT5A in Panc-1, ImimPC1, 8988t und MiaPaca-2 Zellen mittels RNAi reprimiert und anschließend mit TRAIL behandelt. Die fragmentierte DNA wurde mit Propidiumjodid gefärbt und mit Hilfe eines FACScan/FACScalibur quantifiziert. Der Anteil der Zellen in der M1-Phase wurde mit der CELLQuest Software bestimmt. Mit M1 werden die Zellen bezeichnet, die nur wenig DNA enthalten, welches mit einer DNA-Fragmentierung korreliert.

Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen Pankreaskarzinomzellen nach einer Repression von CUTL1 (Abb.25) bzw. WNT5A (Daten nicht gezeigt) eine deutlich gesteigerte Apoptoserate aufwiesen. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung der Zellen mit TRAIL in einigen Zellen noch verstärkt werden.



10³



 PaTu-8988t(n=4)

Abbildung 25 (vorherige Seiten): Analyse der M1-Phase bei Panc-1, 8988t, ImimPC1 und MiaPaca2. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit CUTL1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert, mit 100ng/ml (Panc-1), 75 ng/ml (8988t, ImimPC1) bzw. 50 ng/ml (MiaPaca-2) TRAIL über 20h behandelt. Die DNA-Fragmentierung wurde durch Färbung der DNA mit Propidiumjodid im FACS quantifiziert.

Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein Enzym, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Es wird bei Aktivierung der Apoptosekaskaden gespalten und inaktiviert. Diese Spaltprodukte können mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit CUTL1 bzw. WNT5A siRNA transfiziert, mit TRAIL stimuliert und Zelllysate auf Spaltprodukte von PARP analysiert. Nach Repression von CUTL1 bzw. WNT5A konnten bei allen Zelllinien die aktive und inaktive Form von PARP gezeigt werden (Abb.26). Durch zusätzliche TRAIL-Behandlung wurde dieser Effekt noch verstärkt. Dies zeigt die antiapoptotische Wirkung von CUTL1 und WNT5A und bestätigt die Ergebnisse der durchflusszytometrische Analysen. Es zeigt außerdem, dass eine Repression von CUTL1 bzw. WNT5A eine Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose zur Folge hat.



Abbildung 26: Repression von CUTL1 bzw. WNT5A führt zur Spaltung der PARP. Panc-1, PaTu-8988t, ImimPC-1 und MiaPaca-2 wurden mit CUTL1, WNT5A siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und 20h mit TRAIL behandelt. Anschließend wurden die Spaltprodukte von PARP mittels Western-Blot und einem spezifischen PARP-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

Mit Hilfe des CellDeath Detection Eliza^{PLUS} wird die Fragmentierung calorimetrisch über Antikörperbindung ermittelt. Auch hier wurde CUTL1 bzw. WNT5A durch RNAi reprimiert und ein Effekt photometrisch ermittelt. Es zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate nach Repression von CUTL1 bzw. WNT5A, die durch eine Behandlung der Zellen mit TRAIL noch gesteigert werden konnte (Abb.27).



Abbildung 27: Detektion der DNA-Fragmentierung mittels CellDeath Detection Eliza^{PLUS}. Panc-1, PaTu-8988t, ImimPC1 und MiaPaca-2 wurden mit CUTL1, WNT5A bzw. Kontroll siRNa transfiziert, mit TRAIL über 20h behandelt und die DNA-Fragmentierung mit Hilfe de CellDeath Detetion Eliza^{PLUS} nach Angaben des Hersteller quantifiziert.

Für die Durchführung des TUNEL-Assays wurde die CUTL1 bzw. WNT5A Expression in Panc-1, PaTu-8988t, ImimPC1 und MiaPaca-2 mittels RNAi reprimiert und apoptotische Zellen mit dem DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System (Promega) analysiert. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nach einer Repression von CUTL1 (Abb.28A) und WNT5A (Abb.28B), welche durch ein TRAIL-Behandlung noch verstärkt werden konnte (Abb. 28). Dies bestätigt die Ergebnisse aller Versuche zur Detektion der DNA-Fragmentierung, wonach der Transkriptionsfaktor CUTL1 und WNT5A eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien spielen.



Abbildung 28: TUNEL-Assay. Panc-1, PaTu-8988t, ImimPC-1 und MiaPaca-2 Zellen wurden mit CUTL1 (**A**), WNT5A (**B**) bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Und 20 h mit TRAIL behandelt. Anschließend wurde die DNA-Fragmentierung mit dem DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL System nachgewiesen. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde auf 100 Zellen pro Gesichtsfeld relativiert.

3.5.2 Ermittlung der Caspase-Aktivitäten

Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Caspasen. Aktive Caspasen leiten eine zur Apoptose führende Signalkaskade ein. Es spielen vor allem die Caspasen 3,6,7 und 8 eine große Rolle, da sie Reaktionen einleiten, die zwingend zum Absterben der Zelle führen. Hierzu zählt im Besonderen der DNA-Abbau in der Zelle.

Als nächster Schritt wurde deshalb die Aktivierung der Caspasen 3,7 und 8 in Abhängigkeit von CUTL1 und WNT5A untersucht. Hierzu wurde zunächst CUTL1 bzw. WNT5A mittels RNAi reprimiert, die Zellen mit TRAIL behandelt und die Aktivität der Caspase 3 und Caspase 7 in einem Luciferase-Assay (Caspase-Glo[®]3/7-Assay) durch Messung der Biolumineszenz ermittelt (Abb.29). Es konnte in allen Zellen eine Aktivierung der Caspasen nach Repression von CUTL1 und WNT5A ermittelt werden. Dieser Effekt konnte außerdem durch TRAIL-Behandlung verstärkt werden. Ergebnisse



Abbildung 29: Aktivität der Caspasen 3/7 in Abhängigkeit von CUTL1 (A) und WNT5A (B). Panc-1, 8988t, ImimPC-1 und MiaPaca-2 wurden mit siRNA für CUTL1, WNT5A bzw. Kontroll siRNA transfiziert, mit TRAIL behandelt und die Aktivität der Caspasen mit Hilfe des Caspase-Glo[®]3/7-Assays nach Herstellerangaben ermittelt.

Die Caspasen liegen in einer gesunden Zelle als inaktive Procaspasen vor, die erst durch Proteolyse zu funktionsfähigen Enzymen reifen. So bewirkt z.B. die Aktivierung der Procaspase 3 die proteolytische Spaltung in zwei aktive Fragmente. Zum Nachweis dieser Fragmente wurden in Panc-1, PaTu-8988t, ImimPC1 und MiaPaca-2 die Expression von CUTL1 bzw. WNT5A durch RNAi gehemmt, mit TRAIL Apoptose induziert und Gesamtzelllysate isoliert. Anschließend wurde in diesen Lysaten die Aktivierung der Caspasen in einem Western-Blot durch spezifische Antikörper nachgewiesen.



Abbildung 30: (A) Aktivierung der Caspasen 3/8 in Abhängigkeit von CUTL1. In verschiedenen Lysaten aus Zellen, die mit CUTL1 bzw. Kontroll siRNA transfiziert waren, wurde mit spezifischen Antihkörpern die proteolytische Spaltung der Caspasen 3 und 8 nachgewiesen. (B) Aktivierung der Caspasen 3/8 in Abhängigkeit von WNT5A. Auch hier wurde die Expression und Spaltung der Caspasen 3 und 8 in WNT5A siRNA transfizierten Lysaten mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente ß-Aktin.

73

Es konnte gezeigt werden, dass der Gesamt-Caspase-Level der Caspasen 3 und 8 nach Repression von CUTL1 bzw. WNT5A und Behandlung mit TRAIL abnahm und gleichzeitig die Spaltprodukte der Caspase 3 verstärkt nachweisbar waren (Abb. 30).

Somit konnte durch alle Experimente die antiapoptotische Wirkung von CUTL1 und WNT5A in Pankreaskarzinomzellen aufgezeigt werden. Des weiteren sind CUTL1 und WNT5A an der Regulation der TRAIL-induzierten Apoptose beteiligt und eine Repression von CUTL1 und WNT5A führt zu einer Sensitivierung der Zellen auf TRAIL.

4. Diskussion

Die Fähigkeit zu migrieren und in anliegende Gewebe, Blut- und Lymphgefäße einzudringen ist ein entscheidendes Merkmal von Krebszellen und ist Voraussetzung für die Tumorprogression und Metastasenbildung. Der Transkriptionsfaktor CUTL1 wurde bereits als Modulator der Zellmigration identifiziert [Michl et al.2005]. In einer Vielzahl verschiedener Zelltypen führte eine Repression von CUTL1 zu einer reduzierten Motilität und Invasivität der Zellen in vivo und in vitro. Die Expression von CUTL1 ist außerdem notwendig, um die Effekte von TGFß auf die Zellmotilität zu vermitteln. Im klinischen Kontext korreliert die Expression des Transkriptionsfaktors CUTL1 mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebs. Basierend auf diesen Befunden war es wichtig, Zielgene von CUTL1 zu identifizieren, um den Prozess der durch CUTL1-vermittelten Regulation von Migration und Invasion zu charakterisieren. In Expressionsprofilanalysen wurde bereits gezeigt, dass WNT5A, ein Mitglied der WNT-Proteinfamilie, ein mögliches Zielgen von CUTL1 darstellt.

Die Funktion von WNT5A in der Karzinogenese ist noch weitgehend unverstanden und scheint Zelltyp-abhängig zu sein. Zum einen fungiert WNT5A als Tumorsuppressor im Brust- und Nierenkarzinomen sowie in hematopoetischem Gewebe. In verschiedenen Zellsystemen ist beispielsweise beschrieben, dass WNT5A die Effekte anderer WNT-Proteine regulieren kann. So hemmt WNT5A die durch WNT1 vermittelten Transformation von C57MG Zellen [Olson and Gibo 1998]. Passend dazu fungiert WNT5A möglicherweise als guter prognostischer Marker bei Brustkrebs [Dejmek et al. 2005]. Eine Expression von WNT5A verringert außerdem die Tumorprogression in Nierenkarzinomzellen [Olson et al. 1997]. *In vivo* führte ein Verlust von WNT5A zu einer verstärkten Proliferationsrate von B-Zellen [Liang et al. 2003].

Daneben existieren jedoch auch gegensätzliche Daten, die WNT5A als putatives Onkogen beschreiben. WNT5A ist in verschiedenen Zellsystemen in der Lage die Tumorprogression zu fördern. Neben seiner Fähigkeit, die Zellmotilität und Invasivität von Melanomzellen zu steigern [Weeraratna et al. 2002], ist WNT5A in einer Vielzahl verschiedener Tumorgewebe wie Lungen-, Magen- und Prostatakarzinomen stark exprimiert [lozzo et al. 1995; Lejeune et al. 1995; Saitoh et al. 2002]. Beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) ist WNT5A ebenfalls stark exprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert [Huang et al. 2005].

4.1 Die WNT5A Expression im Pankreaskarzinom und seinen Vorläuferläsionen

Obwohl frühere Expressionsprofilanalysen eine geringe Expression von WNT5A im Pankreaskarzinom aufzeigten [Crnogorac-Jurcevic et al. 2001], konnte hier erhöhte mRNAund eine Proteinexpression von WNT5A in Pankreaskarzinomgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die WNT5A Expression in Vorstufen des invasiven Pankreaskarzinoms, den sog. PanIN-Läsionen, hochreguliert ist, unterstreicht zusätzlich die Rolle von WNT5A in der Tumorprogression im Pankreas. Andere Studien zeigten eine verstärkte Expression und Stabilisierung von ß-Catenin in hoch-gradigen PanIN-Läsionen, v.a. in der PanIN2 Läsion und im invasiven Adenokarzinom, was zu einer Aktivierung der kanonische Signalkaskade in der Tumorprogression im Pankreaskarzinom führt [Al-Aynati et al. 2004]. Durch die Translokation von
ß-Catenin kommt es außerdem zur Transkription von Zielgenen wie CyclinD1, c-Myc und MMP7 [Li et al. 2005]. Die Expression von c-Myc, CyclinD1 und MMP7 führt zu einer Degradierung der extrazellulären Matrix, einer unkontrollierten Zellproliferation und Differenzierung [Li et al. 2005]. Einige WNT-Proteine sind ausserdem in der Lage die Translokation von ß-Catenin durch Aktivierung der kanonischen Signalkaskade zu fördern. Außerdem scheint WNT5A im Pankreaskarzinom seine Effekte auch über die nukleäre Translokation von ß-Catenin zu vermitteln (s. 3.3.3). Zusätzlich ist WNT5A als Modulator der Proliferation von Vorläuferzellen in der Wachstumszone und dem paraxialen Mesoderm und somit als wichtiger Bestandteil der Embryogenese beschrieben [Yamaguchi et al. 1999]. Nachdem sich die Abläufe der Proliferation und Migration der Embryogenese teilweise in der Karzinogenese wiederholen, kann vermutet werden, dass WNT5A als onkofetales Protein fungiert, indem es Vorgänge der Karzinogenese und Tumorprogression fördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich auf, dass WNT5A die Zellmotilität und Invasivität von Pankreaskarzinomzellen erhöht. Somit wirkt WNT5A im Pankreas als Onkogen, was auch bereits in Melanomzellen gezeigt werden konnte [Weeraratna et al. 2002] und nicht wie in anderen Zellsystemen als Tumorsuppressor [Liang et al. 2003; Olson and Gibo 1998; Olson et al. 1997, Jonsson et al. 2002, Kremenevskaja et al. 2005].

4.2 Der Transkriptionsfaktor CUTL1 vermittelt seine Effekte auf Migration und Invasion über WNT5A

Mit Hilfe der siRNA Technologie wurde die Regulation von WNT5A durch den Transkriptionsfaktor CUTL1 untersucht. Dadurch konnten die Ergebnisse aus den Expressionsprofilanalysen und somit die Rolle von WNT5A als Zielgen von CUTL1 bestätigt werden. Um die Relevanz von WNT5A in der durch CUTL1 vermittelten Migration und Invasion zu untersuchen, wurde der Effekt des Knock-Downs von WNT5A in Abhängigkeit von der CUTL1-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor CUTL1 seine Effekte auf Migration und Invasion zu einem großen Teil, aber nicht ausschließlich über WNT5A vermittelt. Um herauszufinden, welche Faktoren, neben WNT5A, an den CUTL1-vermittelten Effekten auf Migration und Invasion beteiligt sind, sollten noch weitere Zielgene von CUTL1 untersucht werden. In Expressionsprofilanalysen konnten bereits PTN (Pleiotrophin) und ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) als weitere potentielle Zielgene von CUTL1 identifiziert werden [Michl et al. 2005]. PTN spielt bei der Migration von Glioblastomzellen eine große Rolle [Lu et al. 2005; Ulbricht et al. 2006]. Die Migration in Melanomzellen [van Kempen et al. 2000] und Brustkarzinomzellen [Jezierska et al. 2006] wird über ALCAM reguliert. CUTL1 vermittelt auch seine Effekte auf die Migration in Pankreaskarzinomzellen über Src, ein Mitglied der Src Protein Tyrosin Kinase Familie [Aleksic et al. 2007]. CUTL1 reguliert die mRNA und Protein Expression von Csk (C-terminale Src Kinase), wodurch das Src Protein stabilisiert wird und es so zu einer verstärkten Migrationsrate kommt [Aleksic et al. 2007].

CUTL1 ist an der Regulation von Vorgängen der Embryogenese und Differentierung beteiligt [Nepveu 2001] und in verschiedenen Tumorgeweben stark exprimiert [Michl et al. 2005]. Somit kann vermutet werden, dass CUTL1 wie WNT5A als onkofetales Protein fungiert, da durch CUTL1 Prozesse der Tumorprogression wie Migration und Invasion reguliert werden [Michl et al. 2005]. WNT5A scheint deshalb eine wichtige Rolle als Zielgen von CUTL1 zu spielen.

4.3 WNT5A aktiviert die kanonische Signalkaskade in Pankreaskarzinomzellen

Da WNT5A in verschiedenen Tumortypen unterschiedliche Auswirkungen besitzt, ist es essentiell die Weiterleitung eines durch WNT5A ausgelösten Signals über die unterschiedlichen Signalkaskaden im jeweiligen Zellkontext genauer zu untersuchen. Die durch WNT5A ausgelösten Signalkaskaden werden bereits kontrovers diskutiert [Mikels and Nusse 2006]. Meist wird durch WNT5A die nichtkanonische Signalkaskade angeschalten [Dejmek et al. 2006; Kuhl et al. 2000; Liang et al. 2003]. Neben der Aktivierung der nicht-kanonischen, Ca²⁺-abhängigen Signalkaskade, wirkt WNT5A in einigen Zellsystemen inhibierend auf die kanonische Signalkaskade. Je nach Rezeptorkontext aktiviert WNT5A aber auch die kanonische Signalkaskade, abhängig von der Anwesenheit der Rezeptoren Frizzled 4 und LRP5 [Mikels and Nusse 2006]. Durch Reportergen-Analysen nach Expression von WNT5A und mit Hilfe der RNAi Technologie konnte eine Aktivierung des TCF/LEF-Bindeelement in Abhängigkeit von WNT5A beobachtet werden. Außerdem ist WNT5A an der Translokation von ß-Catenin beteiligt. Dieser Effekt konnte nach Hemmung der GSK3beta durch LiCL inhibiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass WNT5A seine Effekte in Pankreaskarzinomzellen zumindest teilweise über die kanonische Signalkaskade vermittelt. Auch von anderen WNT-Proteinen, wie z.B. WNT1 im Kolonkarzinom, werden die tumorfördernden Effekte über die ß-Catenin-abhängige Signalkaskade übermittelt.

Ein kürzlicher Bericht über eine verstärkte Expression und Stabilisierung von ß-Catenin während der Tumorprogression in den PanIN-Läsionen bekräftigt dieses Ergebnis [Al-Aynati et al. 2004]. Weitere Studien zeigten, dass WNT5A in aus Nabelschnurblut isolierten CD133(+)-Zellen zu einer verstärkten Expression von ß-Catenin mRNA, mit einer darauffolgender Aktivierung der kanonischen Signalkaskade, führte [Nikolova et al. 2007]. In der Brustkarzinom-Zelllinie MCF-7 aktiviert WNT5A sowohl die kanonische Signakaskade als auch den planaren Zellpolaritäts Signalweg (PCP, engl. "planar cell polarity signaling pathway"). WNT5A war in diesen Zellen nicht fähig die Ca²⁺-abhängige Signalkaskade zu aktivieren [Pukrop et al. 2006].

WNT5A kann somit seine Effekte auch über den planaren Zellpolaritätsweg regulieren. So wurde bereits gezeigt, dass WNT5A in murinen NIH3T3-Zellen JNK, eine wichtigen Bestandteil des PCP, aktiviert [Yamanaka et al. 2002]. WNT5A kann auch mit der Rezeptor Thyrosin Kinase Ror2 interagieren und so JNK aktivieren [Oishi et al. 2003]. In dieser Arbeit wurde eine Aktivierung des PCP durch WNT5A in Pankreaskarzinomzellen nicht untersucht und so kann eine Beteiligung dieser Signalkaskade nicht ausgeschlossen werden, insbesondere, da die aktivierenden Effekte auf die kanonische Signalkaskade zwar konstant, aber moderat ausgefallen waren.

4.4 CUTL1 und WNT5A als Bestandteil der TGFß-vermittelten Tumorprogression

CUTL1 wird durch den Wachstumsfaktor TGFß reguliert [Michl et al. 2005]. Eine Regulation von WNT5A durch CUTL1 stellt somit eine neue Möglichkeit der Signalweiterleitung im Rahmen der durch TGFß-vermittelten, pro-migratorischen und pro-invasiven Effekte dar. Unterschiedliche Studien lassen auf eine duale Rolle von TGFß während der Tumorprogression schließen [Blobe et al. 2000; Cui et al. 1996; Wakefield and Roberts 2002]. So zeigt TGFß wachstumshemmende Effekte in gesundem Gewebe und frühen Tumorstadien. Im Laufe der Tumorprogression verliert TGFß seine wachstumshemmende Wirkung und es sind eine gesteigerte Fähigkeit zur Migration und Invasion in Anwesenheit von TGFß zu beobachten. Die Mechanismen, die zu einem Verlust der TGFß-induzierten Wachstumshemmung führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt [Siegel and Massague 2003]. Die Regulation von WNT5A durch den Transkriptionsfaktor CUTL1 spielt hier möglicherweise eine wichtige Rolle. Einer Aktivierung von CUTL1 durch TGFß folgt eine weitere Aktivierung von WNT5A. WNT5A weist in Pankreaskarzinomzellen pro-proliferative Eigenschaften auf. Auch bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen und Endothelzellen wird durch WNT5A die Proliferationsrate gesteigert [Huang et al. 2005; Masckauchan et al. 2006]. Somit könnte die TGFß-CUTL1-WNT5A Signalweiterleitung eventuell einen Mechanismus darstellen, der die wachstumshemmende Wirkung von TGFß im Laufe der Tumorprogression neutralisiert. Allerdings sollten noch weitere Studien über die Interaktion zwischen TGFß, CUTL1 und WNT5A in Abhängigkeit von Zelltyp und Differenzierungsgrad durchgeführt werden um die Aussage dieser Arbeit zu untermauern. Außerdem sollten die Auswirkungen der TGFß-CUTL1-WNT5A Signalweiterleitung in verschiedenen Migrations- und Invasions-Assays weiter untersucht werden.

4.5 WNT5A reguliert die Expression von EMT-Markerproteinen

WNT5A besitzt neben seinen Effekten auf Migration und Invasion in Pankreaskarzinomzellen auch eine Wirkung auf die Expression von Markerproteinen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Die Fähigkeit zur EMT ist eine Voraussetzung für die Invasivität verschiedener Tumortypen wie dem Pankreaskarzinom. Zwar zeigte der durch TGFß regulierte Transkriptionsfaktor CUTL1 keine signifikanten Effekte auf die Expression von EMT-Markerproteinen in epithelialen EpH4-Zellen [Michl et al. 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings signifikante Effekte des CUTL1-Zielgens WNT5A auf die Expression der EMT-Markerprotene E-Cadherin und Vimentin in Panc-1 Zellen beobachtet werden. Panc-1 Zellen wurden hier als geeignetes Modell zu EMT-Untersuchungen im Pankreaskarzinom gewählt [Ellenrieder et al. 2001]. E-Cadherin, ein wichtiger Marker der EMT, trägt zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten bei, seine Suppression korreliert mit der Invasivität der Zellen. E-Cadherin wird durch Repression von WNT5A verstärkt exprimiert. Vimentin, als mesenchymales Markerprotein, wird hingegen reprimiert, d.h. die WNT5A Expression ist mit einer Repression von E-Cadherin und einer erhöhten Die unterschiedlichen Auswirkungen von Expression von Vimentin assoziiert. CUTL1 einerseits und seinem Zielgen WNT5A andererseits auf die EMT dürfte in der unterschiedlichen Wirkungsweise der beiden Proteine begründet sein. So besitzt CUTL1 als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl verschiedener Zielgene und eine Regulation der EMT durch CUTL1 könnte daher in geringerem Maße stattfinden, als eine Regulation der EMT durch ein Zielgen von CUTL1. Zudem kann TGFß die EMT durch direkte Aktivierung von ß-Catenin initiieren [Fischer et al. 2006]. Somit ist die kanonische WNT-Signalkaskade, die im untersuchten Zellsystem durch WNT5A aktiviert wird, an der EMT-Regulation beteiligt. Weitere morphologische und biochemische Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Rolle von WNT5A bei der EMT zu charakterisieren.

4.6 Die Rolle von CUTL1 und WNT5A in der TRAIL-induzierten Apoptose

Neben verändertem Migrations- und Invasionsverhalten stellt die Apoptoseresistenz ein weiteres Merkmal maligner Krebszellen dar. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von CUTL1 und WNT5A auf das Apoptose-Verhalten verschiedener Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen.

Zur Ermittlung der Effekte von CUTL1 und WNT5A auf die Apoptose wurde die Stärke der DNA-Fragmentierung, die proteolytische Spaltung des Enzyms PARP und die Aktivierung der Caspasen 3,7 und 8 in Abhängigkeit von CUTL1, WNT5A und TRAIL analysiert. TRAIL induziert Apoptose über eine Bindung an sog. Todesrezeptoren (DR4 und DR5) bzw. Decoy-Rezeptoren. Nach der Rezeptor-Trimerisierung kommt es zur Aktivierung verschiedener Initiator- und Effektor-Caspasen und die Apoptose wird eingeleitet. Aufgrund dieser Eigenschaften wird TRAIL zur Zeit für seine Eignung als Therapeutikum für die Krebstherapie getestet.

Nach anti-sense Repression des murinen Homologs von CUTL1, Cux-1, konnte ein verstärkte Apoptoserate bereits gezeigt werden [Quaggin et al. 1997]. Außerdem erfolgte in Cux-1 Knock-Out Mäusen eine verminderte Expression antiapoptotischer und eine dafür verstärkte Expression pro-apoptotischer Faktoren [Sinclair et al. 2001]. WNT5A weist auch antiapoptotische Eigenschaften auf. So wirkt WNT5A über die kanonische Signalkaskade und die Regulation der Src/ERK und PI3Kinase/Akt Kaskaden anti-apoptotisch in Osteoblasten [Almeida et al. 2005].

Es ist zudem bekannt, dass durch eine verminderte WNT5A Expression eine verstärkte Caspase-3 Aktivierung ausgelöst wird [Lin et al. 2006]. Eine Beteiligung von CUTL1 in der TRAIL-induzierten Apoptose konnte bisher nicht aufgezeigt werden. Allerdings wurde die WNT-Signalkaskade durch ein RNAi-Screening in

Verbindung mit TRAIL gebracht, indem für das WNT-Zielgen c-Myc, den Transkriptionsfaktor TCF4 und DVL2, das murine Homolog von Dishevelled, eine Beteiligung an der TRAIL-induzierten Apoptose aufgezeigt werden konnte [Aza-Blanc et al. 2003].

In verschiedenen Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CUTL1 und WNT5A anti-apoptotisch wirken. Nach Repression von CUTL1 bzw. WNT5A konnte eine verstärkte DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden, die durch eine Behandlung der Zellen mit TRAIL nochmals verstärkt wurde. Gleiche Ergebnisse konnten beim Nachweis der proteolytischen Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP und der Spaltung und Aktivierung der Caspasen 3,7 und 8 erzielt werden. Die Caspase-Kaskaden wurden nach Behandlung mit TRAIL aktiviert, was allerdings nach Repression von CUTL1 bzw. WNT5A noch deutlich verstärkt wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CUTL1 bzw. WNT5A an der Regulation der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose maßgeblich beteiligt sind. Der genaue Ablauf der apoptotischen Signalkaskaden müsste allerdings noch durch Untersuchung der mitochondrialen Cytochrom c Ausschüttung, Aktivierung der Caspase-9 und weiterer pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Faktoren analysiert werden.

4.5 Schlussfolgerung

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass WNT5A eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression im Pankreaskarzinom spielt. So ist WNT5A im Adenokarzinom und den vorhergehenden prä-invasiven PanIN-Läsionen stark exprimiert und maßgeblich an der Vermittlung der pro-migratorischen und pro-invasiven Effekten von CUTL1 beteiligt. Die hier aufgezeigte TGFß-CUTL1-WNT5A Interaktion stellt somit eine neue Signalkaskade im Pankreaskarzinom dar, über die Migration, Invasion und Tumorprogression reguliert werden. Außerdem konnte eine antiapoptotische Wirkung von CUTL1 und WNT5A im Pankreaskarzinom demonstriert werden, was die bedeutende Rolle von CUTL1 und WNT5A bei der Tumorprogression im Pankreaskarzinom bestätigt.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor CUTL1 fungiert als wichtiger Modulator der Tumorinvasion im Pankreaskarzinom und wird durch TGFß reguliert. In Expressionsanalysen konnte WNT5A als ein mögliches Effektor-Protein von CUTL1 identifiziert werden. WNT5A gehört zur Familie der sezernierten WNT-Proteine und besitzt wichtige Funktionen während der Embryogenese und der Tumorentwicklung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von WNT5A als Zielgen des Transkriptionsfaktors CUTL1 im Pankreaskarzinom funktionell analysiert. Die hier dargestellten Untersuchungen konnten eine starke mRNA und Protein Expression von WNT5A im Adenokarzinom und prä-invasiven PanIN-Läsionen aufzeigen. Durch Reportergen- und Expressionsstudien sowie mit Hilfe der RNAi Technologie konnte dargelegt werden, dass WNT5A durch CUTL1 transkriptionell reguliert wird und eine wichtige Rolle in der TGFß-CUTL1 Signalkaskade besitzt. WNT5A beeinflusst Migration, Proliferation und Invasion verschiedener Zelllinien signifikant, wobei WNT5A als Mediator der promigratorischen und pro-invasiven Effekte von CUTL1 fungiert. WNT5A reguliert außerdem die Expression von E-Cadherin und Vimentin als Markerproteine der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung (EMT). Über Reportergenstudien und Kinase-Assays wurde die Aktivierung der kanonischen und Ca²⁺-abhängigen Signalkaskaden durch WNT5A untersucht. Es zeigte sich, dass WNT5A in Pankreaskarzinomzellen zur Aktivierung der kanonischen Signalkaskade führt, wobei es zur Stabilisierung und nukleären Translokation von ß-Catenin kommt.

In weiterführenden Untersuchungen konnte durch Analyse der DNA-Fragmentierung, Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP und Aktivierung verschiedener Caspasen gezeigt werden, dass CUTL1 und WNT5A eine antiapoptotische Wirkung besitzen. Repression von CUTL1 und WNT5A führte zusätzlich zu einer Sensibilisierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

Diese Ergebnisse liefern neue Einblicke in den Mechanismus der Regulation der Tumorprogression im Pankreaskarzinom.

6. Literaturverzeichnis

Al-Aynati MM, Radulovich N, Riddell RH and Tsao MS (2004). "Epithelial-cadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia." <u>Clin</u> <u>Cancer Res.</u> **10**(4): 1235-40.

Aleksic T, Bechtel M, Krndija D, von Wichert G, Knobel B, Giehl K, Gress TM and Michl P (2007). "CUTL1 promotes tumor cell migration by decreasing proteasomemediated Src degradation." <u>Oncogene.</u>

Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC and Kousteni S (2005). "Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT." J Biol Chem. **280**(50): 41342-51.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y and Alkalay I (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." <u>Genes Dev.</u> **16**(9): 1066-76.

Aza-Blanc P, Cooper CL, Wagner K, Batalov S, Deveraux QL and Cooke MP (2003). "Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening." <u>Mol Cell.</u> **12**(3): 627-37.

Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A and Aaronson SA (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." <u>Nat</u> <u>Cell Biol.</u> **3**(7): 683-6.

Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B and Link KH (2003). "Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts." <u>World J Surg.</u> **27**(10): 1075-84. Bejsovec A (2000). "Wnt signaling: an embarrassment of receptors." <u>Curr Biol.</u> **10**(24): R919-22. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J and Nusse R (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." <u>Nature.</u> **382**(6588): 225-30.

Blobe GC, Schiemann WP and Lodish HF (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." <u>N Engl J Med.</u> **342**(18): 1350-8.

Boutros M and Mlodzik M (1999). "Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways." <u>Mech Dev.</u> **83**(1-2): 27-37.

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." <u>Am J Pathol.</u> **155**(4): 1033-8.

Bradley RS and Brown AM (1990). "The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix." <u>EMBO J.</u> **9**(5): 1569-75.

Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D and Moon RT (1999). "XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development." <u>Development.</u> **126**(14): 3159-70.

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M and Bejsovec A (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." <u>Nature</u>. **395**(6702): 604-8.

Chauhan AK, Li YS and Deuel TF (1993). "Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **90**(2): 679-82.

Chen G, Fernandez J, Mische S and AJ, C (1999). "A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development." <u>Genes Dev.</u> **13**(17): 2218-30.

Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, Kitajewski J and Wang CY (2001). "Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription." <u>J Cell Biol.</u> **152**(1): 87-96.

Chen T, Yang I, Irby R, Shain KH, Wang HG, Quackenbush J, Coppola D, Cheng JQ and Yeatman (2003). "Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli." <u>Cancer Res.</u> **63**(15): 4368-74.

Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, Jones M, Tyson K, Bassi C, Scarpa A and Lemoine NR (2001). "Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia." <u>Oncogene</u>. **20**(50): 7437-46.

Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A and Akhurst RJ (1996). "TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice." <u>Cell.</u> **86**(4): 531-42.

Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J and Leahy DJ (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." <u>Nature.</u> **412**(6842): 86-90.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA and Goodwin RG (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." <u>Immunity.</u> **7**(6): 813-20.

Dejmek J, Dejmek A, Safholm A, Sjolander A and Andersson T (2005). "Wnt-5a protein expression in primary dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis." <u>Cancer Res.</u> **65**(20): 9142-6.

Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin SO, Vogel WF, Landberg G and Andersson T (2005). "Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival." <u>Clin Cancer Res.</u> **11**(2 Pt 1): 520-8.

Dejmek J, Safholm A, Kamp Nielsen C, Andersson T and Leandersson K (2006). "Wnt-5a/Ca2+-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells." <u>Moll Cell Biol.</u> **26**(16): 6024-36.

Dooijes D, van de Wetering M, Knippels L and Clevers H (1993). "The Schizosaccharomyces pombe mating-type gene mat-Mc encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein."<u>J Biol Chem.</u> **268**(33): 24813-7.

Eklof Spink K, Fridman SG and Weis WI (2001). "Molecular mechanisms of betacatenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex." <u>EMBO J.</u> **20**(22): 6203-12.

Ellenrieder V, Adler G and Gress TM (1999). "Invasion and metastasis in pancreatic cancer." <u>Ann Oncol.</u> **4**: 46-50.

Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G and Gress TM (2001). "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation." <u>Cancer Res.</u> **61**(10): 4222-8.

Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G and Gress TM (2001). "TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system." <u>Int J</u> <u>Cancer.</u> **93**(2): 204-11. Ellis T, Gambardella L, Horcher M, Tschanz S, Capol J, Bertram P, Jochum W, Barrandon Y and Busslinger M (2001). "The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle." <u>Genes</u> <u>Dev.</u> **15**(17): 2307-19.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC and Young PR (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem. **273**(23): 14363-7.

Fearnhead NS, Britton MP and Bodmer WF (2001). "The ABC of APC."<u>Hum Mol</u> <u>Genet.</u> **10**(7): 721-33.

Fischer AN, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H and Mikulits W (2006). "PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression." <u>Oncogene.</u>

Fodde R (2003). "The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC." <u>Nat Cell Biol.</u> **5**(3): 190-2.

GenBank "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html."

Giese K, Cox J and Grosschedl R (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." <u>Cell.</u> **69**(1): 185-95.

Goggins M, Hruban RH and Kern SE (2000). "BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications." <u>Am J Pathol.</u> **156**(5): 1767-71.

Goss KH and Groden J (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." <u>J Clin Oncol.</u> **18**(9): 1967-79.

Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D and Xu W (2000). "Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex." <u>Cell</u> **103**(6): 885-96.

Grunert S, Jechlinger M and Beug H (2003). "Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis." <u>Nat Rev Mol Cell</u> <u>Biol.</u> **4**(8): 657-65.

Ha NC, Tonozuka T, Stamos JL, Choi HJ and Weis WI (2004). "Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation." <u>Mol Cell.</u> **15**(4): 511-21.

Hanahan D and Weinberg RA (2000). "The hallmarks of cancer." <u>Cell.</u> **100**(1): 57-70.

Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C and Nepveu A (1995). "DNAbinding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein." <u>Mol Cell</u> <u>Biol.</u> **15**(1): 129-40.

Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R and Polakis P (1999). "The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell." <u>Curr Biol.</u> **9**(4): 207-10.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." <u>Science</u>. **281**(5382): 1509-12.

Hoppler S, Brown JD and Moon RT (1996). "Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in Xenopus embryos." <u>Genes Dev.</u> **10**(21): 2805-17.

Howe JR, Karnell LH, Menck HR and Scott-Conner C (1999). "The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Adenocarcinoma of the small bowel: review of the National Cancer Data Base, 1985-1995." <u>Cancer.</u> **86**(12): 2693-706.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J and Offerhaus GJ (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." <u>Am J Surg Pathol.</u> **25**(5): 579-86.

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB and Nathans J (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." <u>Nature</u>. **398**(6726): 431-6.

Huang CL, 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**(34): 8765-73.

Huber AH and Weis WI (2001). "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin." <u>Cell.</u> **105**(3): 391-402.

lozzo RV, Eichstetter I and Danielson KG (1995). "Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy." <u>Cancer Res.</u> **55**(16): 3495-9.

Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P and Fuchs E (2003). "Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development." <u>Nature</u>. **422**(6929): 317-22.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J and Thun MJ (2007). "Cancer statistics, 2007." <u>CA Cancer J Clin.</u> **57**(1): 43-66.

Jezierska A, Matysiak W and Motyl T (2006). "ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy." <u>Med Sci Monit.</u> **12**(8): BR263-73.

Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO and Andersson T (2002). "Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas." <u>Cancer Res.</u> **62**(2): 409-16.

Jue SF, Bradley RS, Rudnicki JA, Varmus HE and Brown AM (1992). "The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells." <u>Mol Cell Biol.</u> **12**(1): 321-8.

Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K and Nakayama K (1999). "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin." <u>EMBO J.</u> **18**(9): 2401-10.

Korc M (1998). "Role of growth factors in pancreatic cancer." <u>Surg Oncol Clin N</u> <u>Am.</u> **7**(1): 25-41.

Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schofl C, Andersson T and G, B (2005). "Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma." <u>Oncogene.</u> **24**(13): 2144-54.

Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR and Moon RT (2000). "The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." <u>Trends Genet.</u> **16**(7): 279-83.

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." <u>Cancer Res.</u> **66**(21): 10439-48.

Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulsom R and Harris AL (1995). "Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers." <u>Clin</u> <u>Cancer Res.</u> **1**(2): 215-22.

Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." <u>Cell.</u> **94**(4): 491-501.

Li YJ, Wei ZM, Meng YX and Ji XR (2005). "Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis." <u>World J Gastroenterol.</u> **11**(14): 2117-23.

Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R and Jones SN (2003). "Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue." <u>Cancer Cell.</u> **4**(5): 349-60.

Lin CL, Wang JY, Huang YT, Kuo YH, Surendran K and Wang FS (2006). "Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells." <u>J Am Soc Nephrol.</u> **17**(10): 2812-20.

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X and He X (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." <u>Cell.</u> **108**(6): 837-47.

Liu J, Xing Y, Hinds TR, Zheng J and Xu W (2006). "The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for beta-catenin." <u>J Mol Biol.</u> **360**(1): 133-44.

Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, Wang Hy, Hallagan S, Moon RT and Malbon CC (2001). "G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway." <u>Science</u>. **292**(5522): 1718-22.

Liu X, Liu T, Slusarski DC, Yang-Snyder J, Malbon CC, Moon RT and Wang H (1999). "Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **96**(25): 14383-8.

Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS and MacDougald OA (2002). "Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors." <u>J Biol Chem.</u> **277**(14): 38239-44.

Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF and PS, M (2005). "Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin." <u>J Biol Chem.</u> **280**(29): 26953-64.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." <u>Cell.</u> **94**(4): 481-90.

Luong MX, van der Meijden CM, Xing D, Hesselton R, Monuki ES, Jones SN, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Neufeld EJ and van Wijnen AJ (2002). "Genetic ablation of the CDP/Cux protein C terminus results in hair cycle defects and reduced male fertility." <u>Mol Cell Biol.</u> **22**(5): 1424-37.

Luttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Kloppel G, Schmiegel W and Hahn SA (2001). "Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis." <u>Am J Pathol.</u> **158**(5): 1677-83.

MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM and Alnemri ES (1997). "Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL." <u>J Biol Chem.</u> **272**(41): 25417-20.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C (1999). "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **96**(4): 1603-8.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L and Wu D (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." <u>Moll Cell.</u> **7**(4): 801-9.

Masckauchan TN, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li CM, Khoo A, Tycko B, Brown AM and Kitajewski J (2006). "Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2." <u>Mol Biol Cell.</u> **17**(12): 5163-72.

Massague J (1998). "TGF-beta signal transduction." <u>Annu Rev Biochem.</u> **67**: 753-91.

Michl P and Downward J (2006). "CUTL1: a key mediator of TGFbeta-induced tumor invasion." <u>Cell Cycle.</u> **5**(2): 132-4.

Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R, D'Arrigo C, Ryder K, Menke A, Gress T and Downward J (2005). "CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness." <u>Cancer Cell.</u> **7**(6): 521-32.

Mikels AJ and Nusse R (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits betacatenin-TCF signaling depending on receptor context." <u>PLoS Biol.</u> **4**(4): e115.

Miller, JR (2002). "The Wnts." Genome Biol. 3(1).

Miller JR, Hocking AM, Brown JD and Moon RT (1999). "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways." <u>Oncogene</u>.**18**(55): 7860-72.

Moon RT, Brown JD, Yang-Snyder JA and Miller JR (1997). "Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands." <u>Cell.</u> **88**(6): 725-8.

Nepveu A (2001). "Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development." <u>Gene.</u> **270**(1-2): 1-15.

Nicoletti, Migliorati, Pagliacci, Grignani and Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." <u>J Immunol Methods</u>. **139**(2): 271-9.

Nikolova T, Wu M, Brumbarov K, Alt R, Opitz H, Boheler KR, Cross M and Wobus AM (2007). "WNT-conditioned media differentially affect the proliferation and differentiation of cord blood-derived CD133(+) cells in vitro." <u>Differentiation</u>. **75**(2): 100-11.

Nusse R (2001). "Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf." <u>Nature</u>.**411**(6835): 255-6.

Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S and Minami Y (2003). "The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway." <u>Genes Cells.</u> **8**(7): 645-54.

Olson DJ and Gibo DM (1998). "Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation." <u>Exp Cell Res.</u> **241**(1): 134-41.

Olson DJ, Gibo DM, Saggers G, Debinski W and Kumar R (1997). "Reversion of uroepithelial cell tumorigenesis by the ectopic expression of human wnt-5a." <u>Cell</u> <u>Growth Differ.</u> **8**(4): 417-23.

Orford K, Orford CC and Byers SW (1999). "Exogenous expression of betacatenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest." <u>J Cell Biol.</u> **146**(4): 855-68.

Ozawa F, Friess H, Tempia-Caliera A, Kleeff J and Buchler MW (2001). "Growth factors and their receptors in pancreatic cancer." <u>Teratog Carcinog Mutagen.</u> **21**(1): 27-44.

Pandur P and Kuhl M (2001). "An arrow for wingless to take-off." <u>Bioessays.</u> **23**(3): 207-10.

PhilippN http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:SiRNA_and_RNAI_german.png.

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T and De Robertis EM (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." <u>Nature</u>. **397**(6721): 707-10.

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A and Ashkenazi A (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." <u>J Biol Chem.</u> **271**(22): 12687-90.

Polakis P (1997). "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor." <u>Biochim Biophys Acta.</u> **1332**(3): F127-47.

Polakis P (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev. 14(15): 1837-51.

Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L and Binder C (2006). "Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **103**(14): 5454-9.

Qian J, Steigerwald K, Combs KA, Barton MC and Groden J (2007). "Caspase cleavage of the APC tumor suppressor and release of an amino-terminal domain is required for the transcription-independent function of APC in apoptosis." <u>Oncogene.</u>

Quaggin SE, Yeger H and Igarashi P (1997). "Antisense oligonucleotides to Cux-1, a Cut-related homeobox gene, cause increased apoptosis in mouse embryonic kidney cultures." <u>J Clin Invest.</u> **99**(4): 718-24.

Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel 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." <u>Carcinogenesis</u>.

Roberts AB and Wakefield LM (2003). "The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **100**(15): 8621-3.

Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O and Clevers H (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." <u>Nature.</u> **395**(6702): 608-12.

Ruel L, Stambolic V, Ali A, Manoukian AS and Woodgett JR (1999). "Regulation of the protein kinase activity of Shaggy(Zeste-white3) by components of the wingless pathway in Drosophila cells and embryos." <u>J Biol Chem.</u> **274**(31): 21790-6.

Saitoh T and Katoh M (2002). "Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells." <u>Int J Mol Med.</u> **10**(3): 345-9.

Saitoh T, Mine T and Katoh M (2002). "Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer." Int J Mol Med. **9**(5): 515-9.

Sakorafas GH, Tsiotou AG and Tsiotos GG (2000). "Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective." <u>Cancer Treat Rev.</u> **26**(1): 29-52.

Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S and He X (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." <u>Curr Biol.</u> **11**(12): 951-61.

Seol DW, Li J, Seol MH, Park SY, Talanian RV and Billiar TR (2001). "Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis." <u>Cancer Res.</u> **61**(3): 1138-43.

Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, Muthuswamy SK and Brugge JS (2004). "Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> **101**(5): 1257-62.

Sheldahl LC, Park M, Malbon CC and Moon RT (1999). "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." <u>Curr Biol.</u> **9**(13): 695-8.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." <u>Science</u>. **277**(5327): 818-21.

Siegel PM and Massague J (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer." <u>Nat Rev Cancer.</u> **3**(11): 807-21.

Sinclair AM, Lee JA, Goldstein A, Xing D, Liu S, Ju R, Tucker PW, Neufeld EJ and Scheuermann RH (2001). "Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice." <u>Blood.</u> **98**(13): 3658-67.

Slusarski DC, Corces VG and RT, M (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." <u>Nature.</u> **390**(6658): 410-3.

Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB and Moon RT (1997). "Modulation of embryonic intracellular Ca2+ signaling by Wnt-5A." <u>Dev Biol.</u> **182**(1): 114-20.

Staal FJ, Noort Mv M, Strous GJ and Clevers HC (2002). "Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin." <u>EMBO Rep.</u> 3(1): 63-8.

Steigerwald K, Behbehani GK, Combs KA, Barton MC and Groden J (2005). "The APC tumor suppressor promotes transcription-independent apoptosis in vitro." <u>Mol</u> <u>Cancer Res.</u> **3**(2): 78-89.

Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S and Nagayama M (2003). "Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells." <u>Cancer Sci.</u> **94**(7): 593-7.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP and He X (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." <u>Nature.</u> **407**(6803): 530-5.

Tetsu O and McCormick F (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." <u>Nature.</u> **398**(6726): 422-6.

TheWnthomepage "http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html."

Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P and Cohen P (1999). "A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin." <u>FEBS Lett.</u> **458**(2): 247-51.

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

Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL and RT, M (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." <u>J Cell Biol.</u> **133**(5): 1123-37.

Ulbricht U, Eckerich C, Fillbrandt R, Westphal M and Lamszus K (2006). "RNA interference targeting protein tyrosine phosphatase zeta/receptor-type protein tyrosine phosphatase beta suppresses glioblastoma growth in vitro and in vivo." J <u>Neurochem.</u> **98**(5): 1497-506.

van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP and Swart GW (2000). "Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin." <u>Am J Pathol.</u> **156**(3): 769-74.

Wakefield LM and Roberts AB (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis." <u>Curr Opin Genet Dev.</u> **12**(1): 22-9.

Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA and Nathans J (1996). "A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled." <u>J Biol Chem.</u> **271**(8): 4468-76.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M and Trent JM (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." <u>Cancer Cell.</u> **1**(3): 279-88.

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A and DiNardo S (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." <u>Nature.</u> **407**(6803): 527-30.

Welch DR, Fabra A and Nakajima M (1990). "Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A.</u> **87**(19): 7678-82.

Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H and Pals ST (1999). "Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway." <u>Am J Pathol.</u> **154**(2): 515-23.

Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE and Hruban RH (1998). "Inactivation of the p16 (INK4A) tumorsuppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression." <u>Cancer Res.</u> **58**(20): 4740-4. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE and Hruban RH (2000). "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." <u>Cancer Res.</u> **60**(7): 2002-6.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C and Smith CA, ea (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." <u>Immunity.</u> **3**(6): 673-82.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3 and Nusse R (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." <u>Nature.</u> **423**(6938): 448-52.

Willert K, Shibamoto S and Nusse R (1999). "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex." <u>Genes Dev.</u> **13**(14): 1768-73.

WNTWORLD "http://www.gcd.med.umn.edu/millerlab/Wnt/wntworld.html."

Wong GT, Gavin BJ and McMahon AP (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." <u>Mol Cell Biol.</u> **14**(9): 6278-86.

Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW and Pavletich NP (2003). "Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase." <u>Mol Cell.</u> **11**(6): 1445-56.

Xing Y, Clements WK, Kimelman D and Xu W (2003). "Crystal structure of a betacatenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." <u>Genes Dev.</u> **17**(22): 2753-64.

Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP and Jones S (1999). "A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo." <u>Development.</u> **126**(6): 1211-23.
Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S and Nishida E (2002). "JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates." <u>EMBO Rep.</u> **3**(1): 69-75

Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T and Ishimoto A (2002). "Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila." <u>EMBO J.</u> **21**(7): 1733-42.

Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ and Moon RT (1996). "A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway." <u>Curr Biol.</u> **6**(10): 1302-6.

Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D and Moon RT (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3." <u>Genes Dev.</u> **10**(12): 1443-54.

Zhang X, Gaspard JP and Chung DC (2001). "Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia." <u>Cancer Res.</u> **61**(16): 6050-4.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Adler danke ich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertationarbeit in der Inneren Medizin 1.

Herr Prof. Dr. Thomas Gress danke ich für die Überlassung des Themas und die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderen Dank geht an Dr. Patrick Michl für die Betreuung dieser Arbeit, sowie für die vielen Anregungen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und der Erstellung des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch Dr. Malte Buchholz für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Simone Fulda danke ich für die gute Kooperationsarbeit bei den Apoptosexperimenten.

Ferner danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Kerstin Jungert, Claudia Barth, Jessica Motzer, Anita Buck, Alexandra Schatz, Susanne Braun und Claudia Ruhland, für das gute Arbeitsklima, den regen Gedankenaustausch, den Spaß an der Zusammenarbeit und das ein oder andere offene Ohr in schweren Zeiten.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir nicht nur während der Zeit meiner Promotion jede Unterstützung zukommen ließen.