

# **„Spezifische Inhibition des Wnt Signalwegs und die Analyse der Konsequenzen auf zellbiologischer Ebene“**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Annica Vlad-Fiegen  
geb. am 2. Juli 1979 in Marsberg

Mainz, 2008



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der Wnt Signalweg und seine Komponenten.....	1
1.1.1 An der Membran.....	2
1.1.2 Im Zytoplasma.....	3
1.1.2.1 Die normale Zelle in Abwesenheit eines Wnt Signals.....	3
1.1.2.2 Die normale Zelle in Anwesenheit eines Wnt Signals.....	5
1.1.3 Im Zellkern.....	8
1.2 Der Wnt Signalweg in der Krebsentstehung .....	9
1.2.1 APC.....	10
1.2.2 $\beta$ -Catenin.....	11
1.2.3 Die kolorektale Karzinogenese.....	11
1.3 Zielgene des Wnt Signalwegs .....	13
1.3.1 Cyclin D1.....	14
1.3.2 c-Myc.....	18
1.3.3 VEGF.....	21
1.4 $\beta$ -Catenin und seine Rolle als Zytoskelettprotein .....	24
1.5 RNA Interferenz.....	28
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1 Material.....	32
3.1.1 Laborgeräte.....	32
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	34
3.1.3 Chemikalien.....	35
3.1.4 Puffer und Lösungen .....	35
3.1.5 Reagenziensets („Kits“)......	38
3.1.6 Nukleinsäure- und Proteinstandards.....	39

3.1.7 RNA Interferenz (siRNA).....	40
3.1.8 Primer für die quantitative real-time RT PCR.....	40
3.1.9 Antikörper.....	41
3.1.9.1 Primäre Antikörper.....	41
3.1.9.2 Sekundäre Antikörper.....	42
3.1.10 Nährmedien, Zusätze und Antibiotika für die Zellkultur.....	43
3.1.11 Transfektionsreagenz für die Zellkultur.....	43
3.1.12 Zelllinien.....	43
3.1.13 Software.....	44
3.2 Methoden.....	45
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.1.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	45
3.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	45
3.2.1.3 Reverse Transkription.....	46
3.2.1.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	46
3.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese.....	49
3.2.1.6 Reinigung der DNA Fragmente durch Ethanolfällung.....	49
3.2.1.7 DNA-Sequenzierung.....	49
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	51
3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	51
3.2.2.1.1 Auftauen von Zellen.....	51
3.2.2.1.2 Subkultivierung von Zellen.....	51
3.2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	52
3.2.2.1.4 Kryokonservierung.....	52
3.2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA.....	52
3.2.2.2.1 Transiente Transfektion von Zellen.....	52
3.2.2.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels GAPDH siRNA.....	53
3.2.2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels fluoreszenzmarkierter siRNA.....	53
3.2.2.3 Zelllysate aus eukaryotischen Zellen.....	54
3.2.2.4 BrdU Assay.....	54
3.2.2.5 Caspase-3/7 Assay.....	55
3.2.2.6 MTT Assay.....	55
3.2.2.7 Transwell-Migrationsassay.....	56
3.2.2.8 Trypanblaufärbung.....	56
3.2.2.9 VEGF ELISA.....	57

3.2.2.10 Wundheilungsassay.....	57
3.2.3 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie.....	57
3.2.3.1 Fixieren von Zellen mit Formaldehyd.....	58
3.2.3.2 Färbung der Zellkerne mit DAPI.....	58
3.2.3.3 Färbung eukaryotischer Zellen mit MitoTracker® Green FM.....	58
3.2.3.4 Färbung eukaryotischer Zellen mit Phalloidin/TRITC.....	59
3.2.3.5 Immunzytochemische Färbung eukaryotischer Zellen mit Antikörpern.....	59
3.2.3.5.1 Färbung eukaryotischer Zellen mit anti-Ki-67.....	60
3.2.3.5.2 Färbung eukaryotischer Zellen mit anti-E-Cadherin.....	60
3.2.3.5.3 Färbung eukaryotischer Zellen mit $\beta$ -Tubulin.....	61
3.2.3.5.4 Kofärbung eukaryotischer Zellen mit Vinculin- Phalloidin/FITC.....	61
3.2.4 Durchflusszytometrie.....	62
3.2.4.1 Propidiumiodidfärbung zur Zellzyklusanalyse.....	63
3.2.4.2 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	64
3.2.4.3 MitoTracker® Green FM Färbung zur Bestimmung der Mitochondrienmasse.....	64
3.2.4.4 Phalloidin/FITC Färbung zur Bestimmung des F-Aktin Gehalts.....	65
3.2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	65
3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	65
3.2.5.2 Western Blot.....	66
3.2.5.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	66
3.2.5.4 „Strippen“ einer Membran.....	68
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
4.1 Die Modellsysteme.....	69
4.2 <i>CCND1</i> , <i>c-MYC</i> und <i>VEGF</i> als Zielgene des Wnt Signalwegs.....	70
4.3 Regulation der Wnt Zielgene mittels RNA Interferenz.....	75
4.3.1 Inaktivierung der Zielgene auf mRNA Ebene.....	75
4.3.2 Inaktivierung der Zielgene auf Proteinebene.....	76
4.3.3 Zusammenfassung der Regulation mittels RNA Interferenz.....	79
4.4 Regulation der Zellproliferation durch den Wnt Signalweg.....	79
4.4.1 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die DNA Synthese.....	79
4.4.2 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die aktive Zell- proliferation.....	81

4.4.3 Die Rolle des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene in der Zellzyklus- progression.....	86
4.4.4 <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> und <i>TFRC</i> als Zielgene des Wnt Signalwegs.....	89
4.4.4.1 <i>CDKN1A</i> als Zielgen des Wnt Signalwegs.....	89
4.4.4.2 <i>TP53</i> als Zielgen des Wnt Signalwegs.....	91
4.4.4.3 <i>TFRC</i> als Zielgen des Wnt Signalwegs.....	93
4.4.5 Zusammenfassung der Regulation der Zellproliferation.....	94
4.5 Einfluss der Wnt Zielgene auf die Apoptose.....	96
4.5.1 Apoptoserate in siRNA behandelten Zellen.....	96
4.5.2 Lebensfähigkeit in siRNA behandelten Zellen.....	97
4.5.3 Nekrose in siRNA behandelten Zellen.....	99
4.5.4 Zusammenfassung des Einflusses auf die Apoptose.....	100
4.6 Regulation der Mitochondrienaktivität und des Stoffwechsels durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene.....	101
4.6.1 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Mitochondrienmasse.....	101
4.6.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen MitoTracker Green FM- markierter Zellen.....	101
4.6.1.2 Bestimmung der Mitochondrienmasse mittels Durchfluss- zytometrie.....	105
4.6.2 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Stoffwechsellätigkeit.....	108
4.6.3 Zusammenfassung des Einflusses auf den Energiemetabolismus.....	112
4.7 Regulation der Zellmigration durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene...	113
4.7.1 Bestimmung der Zellmigration mittels Transwell-Migrationsassay.....	113
4.7.2 Bestimmung der Zellmigration mittels Wundheilungsassay .....	115
4.7.3 Einfluss des Wnt Signalwegs auf das Aktinzytoskelett.....	117
4.7.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Phalloidin/TRITC- markierter Zellen.....	117
4.7.3.2 Bestimmung des F-Aktin Gehaltes mittels Durchfluss- zytometrie .....	121
4.7.4 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Transkription anti-migratorischer Gene.....	123
4.7.5 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Zellmorphologie.....	126
4.7.5.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen siRNA behandelter Zellen.....	127
4.7.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Tubulin-markierter Zellen.....	130
4.7.6 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Zelladhäsion.....	134

4.7.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen E-Cadherin-markierter Zellen.....	134
4.7.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Vinculin-Phalloidin/TRITC-komarkierter Zellen.....	138
4.7.7 Zusammenfassung der Regulation der Zellmigration.....	142
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>144</b>
5.1 <i>CCND1</i> , <i>c-MYC</i> und <i>VEGF</i> sind Zielgene des Wnt Signalwegs.....	145
5.2 Die Inaktivierung der ausgewählten Wnt Zielgene.....	147
5.3 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation von Tumorzellen.....	148
5.4 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.....	153
5.5 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Stoffwechsellätigkeit und Mitochondrienaktivität in Tumorzellen.....	157
5.6 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration und zelluläre Adhäsion von Tumorzellen.....	163
5.7 Der Wnt Signalweg, seine Zielgene und die Tumorgenese.....	169
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>171</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>173</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>219</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>221</b>
<b>Liste der Publikationen</b> .....	<b>222</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von murinem Wnt3a.	2
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des Wnt Signalwegs in Abwesenheit eines Wnt Signals.	5
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung des Wnt Signalwegs in Anwesenheit eines Wnt Signals.	6
Abb. 1.4:	Modell der sequentiellen Rekrutierung und Amplifikation der Wnt induzierten LRP6 Phosphorylierung.	8
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung des Wildtyp-APC und der verkürzten Form in SW480 Zellen.	10
Abb. 1.6:	Modell der Polypenbildung in Darmkrypten aufgrund von Mutationen in Komponenten des Wnt Signalwegs.	11
Abb. 1.7:	Die drei Ebenen des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene.	13
Abb. 1.8:	Signalwege und biologische Funktionen von VEGF.	23
Abb. 1.9:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von humanem $\beta$ -Catenin	25
Abb. 1.10:	Modell der $\alpha$ -Catenin Funktion in der Aktinpolymerisation.	27
Abb. 1.11:	Der RNA Interferenz Signalweg.	29
Abb. 3.1:	Exemplarische Darstellung einer Zellzyklusanalyse.	64
Abb. 4.1:	Darstellung der verwendeten Modellsysteme.	70
Abb. 4.2:	Darstellung der $\beta$ -Catenin Inaktivierung auf mRNA Ebene.	71
Abb. 4.3:	Der Cyclin D1 Gehalt auf mRNA Ebene nach $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung .	72
Abb. 4.4:	Einfluss von $\beta$ -Catenin auf den c-Myc mRNA Gehalt.	73
Abb. 4.5:	Der VEGF Gehalt auf mRNA Ebene nach $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.	74
Abb. 4.6:	Inaktivierung der Wnt Zielgene in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf mRNA Ebene.	76
Abb. 4.7:	Regulation von Cyclin D1 in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf Proteinebene.	77
Abb. 4.8:	Regulation von c-Myc in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf Proteinebene.	78
Abb. 4.9:	Regulation von VEGF auf Proteinebene in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	78
Abb. 4.10:	Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die DNA Syntheserate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	80
Abb. 4.11:	Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	82
Abb. 4.12:	Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten SW480 Zellen.	83
Abb. 4.13:	Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten HeLa Zellen.	84
Abb. 4.14:	Regulation der Zellproliferation in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	85
Abb. 4.15:	Regulation des Zellzyklus in siRNA behandelten Kolonkarzinomzellen.	87
Abb. 4.16:	Anteil apoptotischer Zellen in der Sub-G <sub>1</sub> Phase in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	88
Abb. 4.17:	Der p21 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	90
Abb. 4.18:	Der p53 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	92
Abb. 4.19:	Der Transferrin Rezeptor mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	94
Abb. 4.20:	Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Apoptoserate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	96



Abb. 4.21: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Lebensfähigkeit in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	98
Abb. 4.22: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Nekrose in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	99
Abb. 4.23: Mitochondrien in HCT116 Zellen.	102
Abb. 4.24: Mitochondrien in SW480 Zellen.	103
Abb. 4.25: Mitochondrien in HeLa Zellen.	104
Abb. 4.26: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Mitochondrienmasse.	106
Abb. 4.27: Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Mitochondrienverteilung in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	107
Abb. 4.28: Der Hexokinase-2 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	109
Abb. 4.29: Der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	110
Abb. 4.30: Der NADH Dehydrogenase mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	111
Abb. 4.31: Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Migration in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	114
Abb. 4.32: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migration in HeLa Zellen.	116
Abb. 4.33: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	118
Abb. 4.34: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten SW480 Zellen.	119
Abb. 4.35: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten HeLa Zellen.	120
Abb. 4.36: Einfluss der jeweiligen siRNA auf den F-Aktin Gehalt in HCT116 Zellen.	121
Abb. 4.37: Einfluss der jeweiligen siRNA auf den F-Aktin Gehalt in SW480 Zellen.	122
Abb. 4.38: Der Thrombospondin-1 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	124
Abb. 4.39: Der ROCK2 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	125
Abb. 4.40: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in HCT116 Zellen.	127
Abb. 4.41: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in SW480 Zellen.	128
Abb. 4.42: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in HeLa Zellen.	129
Abb. 4.43: Mikrotubuli in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	131
Abb. 4.44: Mikrotubuli in siRNA behandelten SW480 Zellen.	132
Abb. 4.45: Mikrotubuli in siRNA behandelten HeLa Zellen.	133
Abb. 4.46: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	135
Abb. 4.47: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten SW480 Zellen.	136
Abb. 4.48: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten HeLa Zellen.	137
Abb. 4.49: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten HCT116 Zellen.	139
Abb. 4.50: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten SW480 Zellen.	140
Abb. 4.51: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten HeLa Zellen.	141
Abb. 5.1 Schematische Darstellung charakteristischer Unterschiede zwischen Zellen eines Tumors und Normalzellen.	144
Abb. 5.2: c-Myc fördert die Zellzyklusprogression durch Genaktivierung und –reprimierung.	150
Abb. 5.3: Regulation der Proliferation in Tumorzellen durch den Wnt Signalweg.	153

---

Abb. 5.4: Zusammenhänge zwischen dem Wnt Signalweg und der Apoptose in Tumorzellen.	157
Abb. 5.5: Die Form der Mitochondrien verändert sich mit dem Energiestatus.	159
Abb. 5.6: Regulation des Energiemetabolismus von Tumorzellen durch den Wnt Signalweg.	163
Abb. 5.7: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Migration von Tumorzellen.	169
Abb. 5.8: Die Rolle des Wnt Signalwegs in der Karzinogenese.	169

## Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Liste der eingesetzten siRNA und deren Sequenzen	40
Tab. 3.2:	Ungekoppelte Erstantikörper für den Nachweis von Proteinen	42
Tab. 3.3:	Gekoppelte Zweitantikörper.	42
Tab. 3.4:	Verwendete Zelllinien und deren Bezugsquelle.	43
Tab. 3.5:	Ansatz für eine cDNA Synthese.	46
Tab. 3.6:	Ansatz für eine quantitative real-time PCR.	47
Tab. 3.7:	Programm für eine quantitative real-time PCR.	47
Tab. 3.8:	Ansatz für eine Sequenzier-PCR.	50
Tab. 3.9:	Programm für eine Sequenzier-PCR.	50
Tab. 3.10:	Bedingungen für die Transfektion von siRNA.	54
Tab. 3.11:	Anregungs- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen für die Immunzytochemie	58
Tab. 3.12:	Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immunzytochemie.	60
Tab. 3.13:	Anregungs- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen für die Durchfluss- zytometrie.	62
Tab. 3.14:	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele zur SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.	66
Tab. 3.15:	Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die immunologische Nachweisreaktion	67
Tab. 4.1:	Verringerung des mRNA Gehaltes ausgewählter Gene nach $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung in verschiedenen Zelllinien.	75
Tab. 4.2:	Verringerung des mRNA- und Proteingehalts der Wnt Zielgene mittels RNA Interferenz.	79
Tab. 4.3:	DNA Synthese in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	81
Tab. 4.4:	Regulation der Zellproliferation in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	85
Tab. 4.5:	Zellzyklusprogression in siRNA behandelten HCT116 und SW480 Zellen.	88
Tab. 4.6:	Verringerung des p21 mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien.	91
Tab. 4.7:	Veränderung des p53 mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien.	93
Tab. 4.8:	Verringerung des Transferrin Rezeptor mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien.	94
Tab. 4.9:	Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf Parameter der Proliferation von Tumor- zellen.	95
Tab. 4.10:	Untersuchung von <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> und <i>TFRC</i> als primäre und sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs in Tumorzellen.	95
Tab. 4.11:	Apoptose in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	97
Tab. 4.12:	Lebensfähigkeit in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	98
Tab. 4.13:	Nekrose in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	100
Tab. 4.14:	Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.	100

Tab. 4.15: Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Mitochondrienmasse in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	107
Tab. 4.16: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Stoffwechsellätigkeit und Mitochondrienfunktion in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	112
Tab. 4.17: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Mitochondrienfunktion und den Stoffwechsel von Tumorzelllinien.	113
Tab. 4.18: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migrationsrate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	115
Tab. 4.19: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migration in HeLa Zellen.	117
Tab. 4.20: Einfluss der siRNA Behandlung auf den F-Aktin Gehalt in HCT116 und SW480 Zellen.	123
Tab. 4.21: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Transkription anti-migratorischer Gene in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.	126
Tab. 4.22: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf Migration und Adhäsion von Tumorzellen.	142
Tab. 4.23: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription ausgewählter Migrationsinhibitoren in Tumorzellen.	143
Tab. 5.1: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation von Tumorzellen.	149
Tab. 5.2: Untersuchung von <i>CDKN1A</i> , <i>TP53</i> und <i>TFRC</i> als primäre und sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs in Tumorzellen.	152
Tab. 5.3: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.	154
Tab. 5.4: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Mitochondrienfunktion und den Stoffwechsel von Tumorzellen.	160
Tab. 5.5.: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration und Adhäsion von Tumorzellen.	165
Tab. 5.6.: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription ausgewählter Migrationsinhibitoren in Tumorzellen.	166

## Abkürzungsverzeichnis

### A

Abb.	Abbildung
Ago2	Argonaut2
Akt	<i>anti-apoptotic kinase</i>
AMD	<i>age-related macular degeneration</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
Arm	Armadillo-Motive
Arp2/3	<i>actin related proteins 2/3</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat

### B

Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl9	<i>B-cell lymphoma 9</i>
Bcl-x <sub>L</sub>	<i>Basal cell lymphoma-extra large</i>
bHLHZ	<i>basic-helix-loop-helix-zipper</i>
Bim	<i><u>Bcl-2 interacting mediator of cell death</u></i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
β-TrCP	<i>β-Transducin repeat Containing Protein</i>
Brg-1	<i>Brahma-protein homolog 1</i>

### C

Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
Cadherin	<i>Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion molecule</i>
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>

CamKII	Calcium/ Calmodulin-abhängige Kinase II
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
<i>CCND1</i>	Gen, das Cyclin D1 kodiert
<i>CCND2</i>	Gen, das Cyclin D2 kodiert
<i>CCNE</i>	Gen, das Cyclin E kodiert
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
C/EBP $\beta$	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein <math>\beta</math></i>
CIP	<i>CDK interacting protein</i>
CK1	Casein Kinase I
<i>CKS</i>	<i>CDC28 protein kinase regulatory subunit</i>
<i>c-Myc</i>	zelluläres Homolog des Onkogens <i>v-myc</i> des Myelocytomatose Retrovirus
<i>CUL-1</i>	<i>cullin-1</i>
CRD	Cystein-reiche Domäne
CRE	<i>cAMP-responsive element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
<i>c-Src</i>	zelluläres Homolog des Onkogens <i>v-src</i> des Rous Sarkoma Virus
CtBP	<i>C-terminal Binding Protein</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
<i>CTNNB</i>	Gen, das $\beta$ -Catenin kodiert
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin

**D**

DAG	Diacylglycerol
DAI	<i>double-stranded RNA-activated inhibitor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DIX	Dishevelled-Axin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMPI	<i>cyclin D-binding myb-like protein 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT3a	DNA Methyltransferase 3a
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
Dvl	Dishevelled
DYRK	<i>dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase</i>

**E**

E-Box	<i>enhancer box</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
eNOS	<i>endothelial constitutive nitric oxide synthase</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und Co-Autoren)

**F**

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBW7	<i>F-box and wd40 domain protein 7</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Frat	<i>frequently rearranged in T cell lymphoma</i>
Fz	Frizzled

**G**

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GSK-3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$

**H**

HD	Histon-Deacetylasen
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
<i>HK2</i>	Gen, das Hexokinase-2 kodiert
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMG	<i>high mobility group</i>
HNPPC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
HPV-18	Humaner Papillomavirus-18
HRE	<i>hypoxic response element</i>
HRPO	<i>Horseradish Peroxidase</i>

**I**

IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
INK4	<i>Inhibitor of CDK4</i>
int	<i>integration site</i>
IP <sub>3</sub>	IP <sub>3</sub> -Inositol 1,4,5-Triphosphat
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>

**J**

JNK	Jun N-terminale Kinase
-----	------------------------

**K**

kb	Kilobasenpaar
KIP	<i>Kinase inhibitory protein</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>



**L**

LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
Lgr5	<i>leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>

**M**

Mad	<i>Max dimerization</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
Max	<i>Myc associated factor x</i>
MB	Myc Box
MCR	<i>mutation cluster region</i>
MEFs	<i>mouse embryo fibroblasts</i>
Met	<i>Mesenchymal epithelial transition factor</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
Miz1	<i>Myc-interacting zinc finger protein 1</i>
MLC	<i>myosin light chain</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
Mnt	<i>Max-interacting protein</i>

**N**

<i>NDUFV1</i>	Gen, das NADH Dehydrogenase Ubiquinon Flavoprotein 1 kodiert
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
Nrp	Neuropilin
N-Terminus	Aminoterminus

**P**

PAF	Polymerase assoziierter Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
<i>PDHB</i>	Gen, das Pyruvat Dehydrogenase $\beta$ kodiert
<i>PK1</i>	Gen, das Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 kodiert
PDZ	<i>post synaptic density protein PSD95; Drosophila disc large tumor suppressor DlgA; zonula occludens-1 protein zo-1</i>
PEST	Pro, Glu, Ser/Thr
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Plgf	<i>placenta growth factor</i>
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
PVDF	Polyvinylidifluorid

**Q**

qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
---------	-----------------------------------

**R**

Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastoma
RGS	<i>regulator of G-protein signaling</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
RIG-1	<i>retinoic acid gene 1</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )

RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffmoleküle ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
SAMP	(Serin, Alanin, Methionin, Prolin)-Motive
SAPK/JNK	<i>stress-activated protein kinase/c-jun NH2-kinase</i>
SCF	SKP1-Cullin-F-Box-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP-1	Sp1 Transkriptionsfaktor
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SWI/SNF	<i>switching-defective and sucrose nonfermenting</i>
<b>T</b>	
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrin Rezeptor
<i>TFRC</i>	Gen, das den Transferrin Rezeptor kodiert
TLE	<i>Transducin-like enhancer protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
TRRAP	<i>transformation/transcription domain-associated protein</i>
<i>TSP1</i>	Gen, das Thrombospondin-1 kodiert

TSP1                      Thrombospondin-1

## U

UV                        Ultraviolett

## V

VEGF                    *vascular endothelial growth factor*

VEGFR                 Vegf Rezeptor

VHL                      von Hippel-Lindau

## W

WAF                     *wild-type p53-activated fragment*

wg                        *wingless*

## Abkürzungsverzeichnis für Aminosäuren

Abkürzungen für Aminosäuren werden im Ein- beziehungsweise Drei-Buchstaben-Code wiedergegeben.

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanin
<b>C</b>	<b>Cyc</b>	Cystein
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Aspartat/Asparaginsäure
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Glutamat/Glutaminsäure
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycin
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidin
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucin
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysin
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucin
<b>M</b>	<b>Met</b>	Methionin
<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagin
<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolin
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamin
<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginin
<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serin
<b>T</b>	<b>Thr</b>	Threonin
<b>V</b>	<b>Val</b>	Valin
<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosin



# 1. Einleitung

## 1.1 Der Wnt Signalweg und seine Komponenten

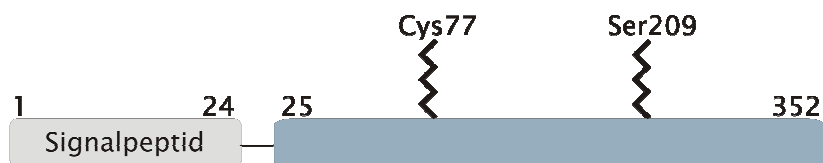
Der Wnt Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Mobilität und Differenzierungsprozessen der embryonalen Entwicklung. Darüber hinaus ist er bei der Festlegung des Zellschicksals, der Zellpolarität und morphologischen Veränderungen von Bedeutung (Arce *et al.*, 2006). Der Wnt Signalweg ist in Vertebraten und Invertebraten evolutionär hoch konserviert und wurde nach seinem primären Liganden, den sekretierten Wnt Proteinen, benannt. Der heutige Begriff *Wnt* ist ein Akronym der beiden Namen *wingless* und *int-1*. Das Segment-Polaritätsgen *wingless* (*wg*, flügellos) wurde in den 1970er Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo es für die Entwicklung der Flügel wichtig ist (Sharma, 1973; Sharma & Copra, 1976; Morata & Lawrence, 1977). In den 1980er Jahren wurde schließlich das Homolog der Maus und des Menschen *Int-1* (*integration site*) identifiziert und als Protoonkogen beschrieben (Nusse & Varmus, 1982; Nusse *et al.*, 1984; van Ooyen *et al.*, 1985, Rijsewijk *et al.*, 1987).

In der klassischen Einteilung wird ein kanonischer Wnt Signalweg von zwei nicht-kanonischen unterschieden (Lustig & Behrens, 2003). Der kanonische Signalweg wird auch als Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg bezeichnet, da hier das Protoonkoprotein  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle spielt. Über seine zelluläre Konzentration wird die Expression der Zielgene des Wnt Signalwegs reguliert. Darüber hinaus gibt es den Wnt/Planare Zellpolarität Signalweg (Wnt/PCP, *planar cell polarity*), der die Organisation des Zytoskeletts über die Aktivierung der Jun N-terminalen Kinase (JNK) Kaskade und GTPasen der Rho-Familie reguliert (Veerman *et al.*, 2003). Hiervon unterscheidet sich der ebenfalls nicht-kanonische Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg. Dieser führt über ein heterotrimeres G-Protein zum Anstieg der intrazellulären Kalzium-Ionen Konzentration. Durch diesen Anstieg werden Kalzium sensitive Proteinkinasen wie CamKII (Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II) oder PKC (Proteinkinase C) aktiviert (Veerman *et al.*, 2003).

Die strikte klassische Einteilung entspricht jedoch eher einem allgemeinen Modell, da die Aktivierung der jeweiligen Signalwege stark vom zellulären Umfeld und von der Zusammensetzung der Ligand-Rezeptorkomplexe abhängt (Mikels & Nusse, 2006; Logan & Nusse, 2004). Dementsprechend wurde kürzlich gezeigt, dass Wnt5a, das bis dahin als nicht-kanonisches Wnt Protein galt (Kühl, 2004), den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg aktiviert, wenn es mit dem Rezeptor Frizzled 4 interagiert (Mikels & Nusse, 2006).

### 1.1.1 An der Membran

Wnt Proteine sind eine große Familie sekretierter Glykoproteine mit 19 bekannten Mitgliedern im Menschen (Logan & Nusse, 2004). Sie sind durch eine große Anzahl konservierter Cysteinreste und Lipidmodifikationen gekennzeichnet. Obwohl die Primärsequenz der Wnt Proteine es nicht vermuten lässt, handelt es sich bei ihnen um hydrophobe Proteine. Die erste von zwei bekannten Lipidmodifikationen wurde 2003 von Willert *et al.* an einem konservierten Cysteinrest (Cys77 in murinem Wnt3a) identifiziert. Die Palmitoylierung dieses Cysteinrestes scheint für die Aktivität des Proteins wichtig zu sein (Willert *et al.*, 2003). Bei der zweiten Lipidmodifikation von murinem Wnt3a handelt es sich um die Palmitoylierung von Serin 209, einer weiteren konservierten Aminosäure (Takada *et al.*, 2006). Die posttranslationale Modifikation scheint im intrazellulären Transport sowie der Sekretierung des Proteins eine wichtige Rolle zu spielen. Die dreidimensionale Struktur der Wnt Proteine ist zurzeit noch nicht geklärt. Abbildung 1.1 zeigt ein Schema der Domänenstruktur von murinem Wnt3a.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von murinem Wnt3a.** Bei den Aminosäuren eins bis 24 handelt es sich um das Signalpeptid, während das reife Protein aus den Aminosäuren 25 bis 352 besteht.

Der Wnt Signalweg wird aktiviert, indem Wnt an der Zelloberfläche an seine zwei Rezeptoren Frizzled (Fz) und LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) bindet. Frizzled-Rezeptoren gehören zur Familie der Sieben-Transmembranproteine, die über eine N-terminale cysteinreiche Domäne (CRD) mit Wnt interagieren (Bhanot *et al.*, 1996). In Vertebraten sind bislang zehn verschiedene Gene bekannt, die Frizzled Rezeptoren kodieren (Amerongen & Berns, 2006). Bei LRP5/6 handelt es sich um einen Rezeptor, der die Membran einmal durchspannt. In Vertebraten gibt es zwei Gene, *lrp5* und *lrp6*, die diesen Rezeptor kodieren (Amerongen & Berns, 2006). Es wird angenommen, dass Wnt gleichzeitig an beide Rezeptoren bindet, obwohl bis heute ein solcher trimerer Komplex noch nicht nachgewiesen werden konnte (Pinson *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000, Tamai *et*



*al.*, 2004). Allerdings reicht die physikalische Nähe von Frizzled und LRP6 aus, um den Wnt Signalweg auszulösen (Liu *et al.*, 2002; Tolwinski *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2008).

Außerdem können verschiedene extrazelluläre Inhibitoren an die entsprechenden Rezeptoren binden und auf diese Weise die Aktivierung des Wnt Signalwegs verhindern beziehungsweise modulieren. Beispielsweise wirkt Dickkopf-1 (Dkk-1) durch Bindung an LRP5/6 als Rezeptorantagonist (Giles *et al.*, 2003), während lösliche Frizzled-ähnliche Proteine (sFRPs, *soluble Frizzled-related proteins*) und Wnt inhibierende Faktoren (WIF) die Rezeptorinteraktion durch Bindung an das Wnt Protein selbst verhindern (Logan & Nusse, 2004).

## 1.1.2 Im Zytoplasma

### 1.1.2.1 Die normale Zelle in Abwesenheit eines Wnt Signals

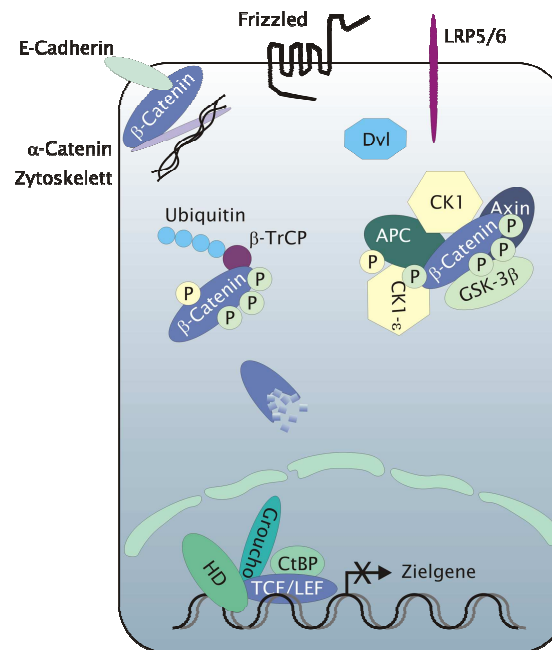
Im kanonischen Wnt Signalweg spielt das Protoonkoprotein  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle. In Abwesenheit eines Wnt Signals wird freies  $\beta$ -Catenin kontinuierlich abgebaut, wodurch seine zytoplasmatische und schließlich auch nukleäre Konzentration gering gehalten und die Expression der Wnt Zielgene reprimiert wird (Abbildung 1.2).

Dabei wird  $\beta$ -Catenin zunächst durch einen Multienzymkomplex, dem so genannten Zerstörungskomplex, gebunden. Dieser besteht aus den Gerüstproteinen APC (Adenomatöse Polyposis Coli) und Axin oder Conductin/Axin2 sowie den beiden Serin/Threonin Kinasen Casein Kinase 1 (CK1) und Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). In diesem Komplex kommt Axin eine besondere Rolle zu, da es alle Komponenten zusammen bringt. So bindet Axin APC über eine N-terminale RGS- (*regulator of G-protein signaling*) Domäne und drei SAMP (Serin, Alanin, Methionin, Prolin)-Motive von APC (Behrens *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 1998; Kishida *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann Axin über zentrale Regionen die Kinasen CK1- $\alpha$ , - $\delta$  und - $\epsilon$  sowie GSK-3 $\alpha$  und - $\beta$  binden. Außerdem bindet es auch an  $\beta$ -Catenin, so dass die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und APC durch CK1 und GSK-3 möglich ist (Ikeda *et al.*, 1998; Price, 2006). Im ersten Schritt wird  $\beta$ -Catenin durch CK1- $\alpha/\epsilon$  an Serin 45 phosphoryliert. Dies führt dazu, dass GSK-3 $\beta$  nachfolgend drei weitere konservierte Aminosäuren (Threonin 41, Serin 37 und Serin 33) phosphorylieren kann (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Price, 2006) (Abbildung 1.9). Durch diese Phosphorylierungen wird ein Bindungsmotiv für das F-Box Protein  $\beta$ -TrCP ( *$\beta$ -Transducin repeat Containing Protein*) geschaffen. Hierbei handelt es sich um eine Komponente des Ubiquitin-Ligase Komplexes,

welche die Polyubiquitinierung des  $\beta$ -Catenins einleitet und es so für den proteasomalen Abbau markiert (Aberle *et al.*, 1997; Winston *et al.*, 1999). Axin selbst ist ebenfalls ein Substrat von GSK-3 $\beta$  und die Kinase kann die Lebensdauer von Axin durch Phosphorylierung erhöhen (Yamamoto *et al.*, 1999). Darüber hinaus werden die  $\beta$ -Catenin-bindenden 15- und 20-Aminosäuresequenz-wiederholungen von APC im Zerstörungskomplex durch die Kinasen CK1- $\epsilon$  und GSK-3 phosphoryliert, wodurch seine Affinität zu  $\beta$ -Catenin deutlich zunimmt (Ha *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2004). Vermutlich wird somit die Freisetzung von phosphoryliertem und Ubiquitin-markiertem  $\beta$ -Catenin gefördert (Ha *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2004). Das Modell von Willert und Jones (2006) postuliert, dass zunächst unphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin und APC an Axin binden, woraufhin beide Proteine durch die Kinasen CK1 und GSK-3 phosphoryliert werden. Dies führt zu einer erhöhten Affinität des APC zu  $\beta$ -Catenin, so dass  $\beta$ -Catenin nun an APC bindet. Nachfolgend wird Axin freigesetzt und kann ein neues, unphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin Molekül binden. Das phosphorylierte, an APC gebundene  $\beta$ -Catenin wird von  $\beta$ -TrCP erkannt und gebunden. Allerdings ist bislang unklar, wodurch die Ablösung des  $\beta$ -Catenins von APC initialisiert wird.

In Abwesenheit eines Wnt Signals befindet sich nur wenig  $\beta$ -Catenin im Zellkern. In diesem Fall wirken Proteine der TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) Familie als Transkriptionsrepressoren, indem sie mit weiteren Korepressoren interagieren. TCF/LEF Proteine haben eine N-terminale  $\beta$ -Catenin Bindungsdomäne, ein C-terminales Kernlokalisationssignal NLS (*nuclear localization signal*) sowie eine HMG (*high mobility group*) DNA-Bindungsdomäne nahe des C-Terminus (van Noort & Clevers, 2002). Letztere bindet in der kleinen Furche der DNA-Helix, so dass diese in einem Winkel von über 90° gekrümmt wird und so die Bindung weiterer Faktoren ermöglicht (Grosschedl *et al.*, 1994; Giese *et al.*, 1995). Das hochkonservierte DNA-Motiv, an dem diese Bindung erfolgt, hat die Konsensussequenz 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (Roose & Clevers, 1999). Zu den Korepressoren, mit denen Proteine der TCF/LEF Familie interagieren, gehören zum Beispiel Proteine der Groucho Familie (Grg/TLE, *Transducin-like enhancer protein*) und CtBP (*C-terminal Binding Protein*) (Cavallo *et al.*, 1998; Roose *et al.*, 1998; Brannon *et al.*, 1999). Proteine der Groucho Familie inhibieren die Transkription, indem sie Histon-Deacetylasen (HD) rekrutieren, die zu einer Kondensation des Chromatins führen (Chen *et al.*, 1999a). Außerdem wurde berichtet, dass GSK-3 $\beta$  mit Groucho/TLE kolokalisiert, wodurch vermutlich die Repression der Wnt Zielgene unterstützt wird (Willert & Jones, 2006). CtBP dagegen ist eine schwache NAD/NADH regulierte Dehydrogenase, die epigenetische

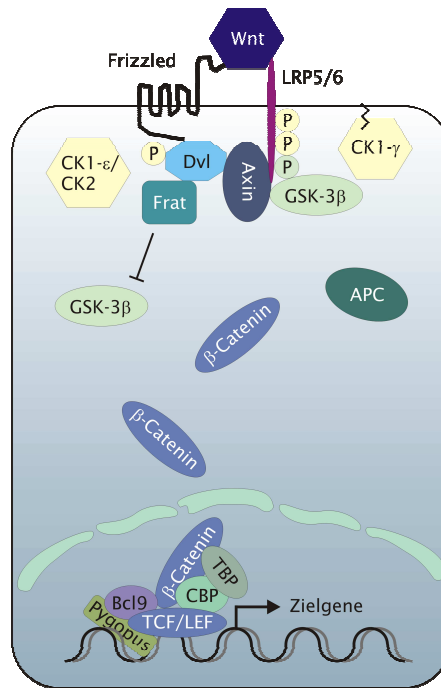
Chromatinmodifikation durch Interaktion mit dem Korepressor Polycomb beeinflusst (Chinnadurai, 2002). Darüber hinaus gibt es auch dominant-negative TCF/LEF Proteine, die als Splice-Varianten entstehen. Ihnen fehlt die N-terminale Bindungsdomäne für  $\beta$ -Catenin (van de Wetering *et al.*, 1996).



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des Wnt Signalwegs in Abwesenheit eines Wnt Signals. Ohne Wnt Signal wird  $\beta$ -Catenin kontinuierlich abgebaut, so dass die Zielgenexpression gehemmt ist.

### 1.1.2.2 Die normale Zelle in Anwesenheit eines Wnt Signals

Der kanonische Wnt Signalweg wird durch die extrazelluläre Bindung des Liganden Wnt an seine Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 aktiviert. Die intrazelluläre Weiterleitung des Signals hat die Akkumulation von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin zur Folge, so dass dieses schließlich in den Zellkern transloziert und dort die Expression der Zielgene aktiviert (Abbildung 1.3) (Logan & Nusse, 2004; Clevers, 2006).



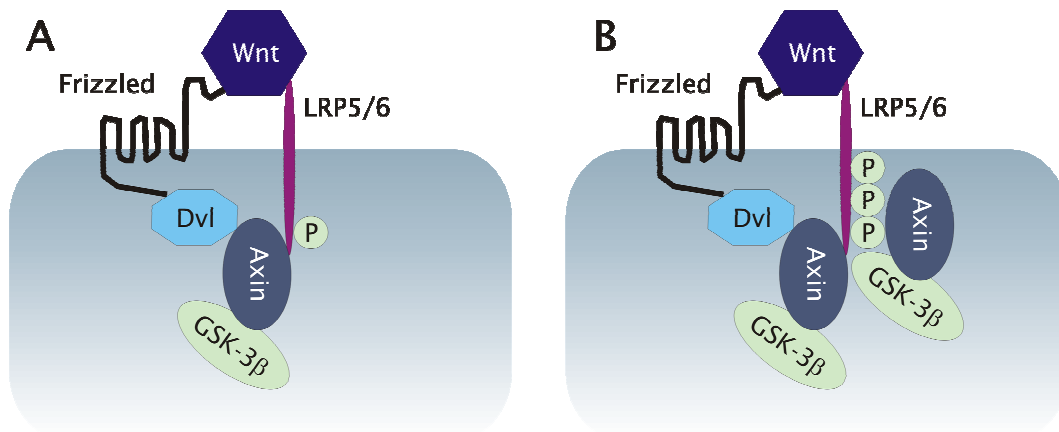
**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Wnt Signalwegs in Anwesenheit eines Wnt Signals.** Die Aktivierung des Wnt Signalwegs führt zu einer Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und so zur Aktivierung der Zielgenexpression im Zellkern.

Die Aktivierung der Wnt Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 führt zunächst zur Hyperphosphorylierung des zytoplasmatischen Proteins Dishevelled (Dvl; Dsh in *Drosophila*) (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2004), welches in der Aktivierung des Wnt Signalwegs eine zentrale Bedeutung hat. Die Hyperphosphorylierung erfolgt an mehreren Aminosäuren durch die Serin/Threonin Kinasen CK1- $\epsilon$  und CK2, wobei bislang noch unklar ist, wie diese Phosphorylierungen reguliert werden (Peters *et al.*, 1999; Cong *et al.*, 2004; Willert *et al.*, 1997). Dvl interagiert über seine PDZ-Domäne (*post synaptic density protein* PSD95; *Drosophila disc large tumor suppressor* DlgA; *zonula occludens-1 protein* zo-1) mit einem C-terminalen Lys-Thr-X-X-X-Trp Motiv des Frizzled Rezeptors (Umbhauer *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003). Ob jedoch die Bindung von Wnt an Frizzled direkt eine Fz-Dvl-Interaktion induziert, ist bislang unklar. Weiterhin ist gezeigt worden, dass phosphoryliertes Dvl Frat (*frequently rearranged in T cell lymphoma*) zum Zerstörungskomplex rekrutiert, was zur Inhibition von GSK-3 $\beta$  führt (Yanagawa *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001; Hino *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2006) und die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin hemmt. Darüber hinaus kann Dvl über seine N-terminale DIX-Domäne (Dishevelled-Axin) mit der C-terminalen DIX-Domäne von Axin interagieren (Kishida *et al.*, 1999). Axin ist eine zweite Komponente, der eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des Wnt Signalwegs zukommt. Es

kann an den Korezeptor LRP6 binden (Mao *et al.*, 2001; Tamai *et al.*, 2004), wobei diese Bindung durch eine Phosphorylierung des Rezeptors begünstigt wird (Tolwinski *et al.*, 2003). Im ersten Schritt erfolgt die Phosphorylierung von LRP6 an den Aminosäuren Serin beziehungsweise Threonin in einem zentralen prolinreichen Motiv (PPPS/TP), welches sich fünfmal in der zytoplasmatischen Domäne von LRP6 wiederholt (Nusse, 2005). Diese werden durch die Kinase GSK-3 $\beta$  phosphoryliert (Zeng *et al.*, 2005). Lange Zeit war unklar, ob diese Phosphorylierungen durch die Aktivierung des Wnt Signalwegs induziert werden (Zeng *et al.*, 2005) oder ob diese Aminosäuren in der Zelle konstitutiv phosphoryliert vorliegen (Davidson *et al.*, 2005). Neuere Studien unterstützen das Modell von Zeng *et al.* (2005), das von einer Wnt-abhängigen Phosphorylierung des PPPS/TP Motivs durch GSK-3 $\beta$  ausgeht (Binnerts *et al.*, 2007; Bryja *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnten Zeng *et al.* (2008) kürzlich zeigen, dass diese Phosphorylierung sowohl durch GSK-3 $\alpha$  als auch durch GSK-3 $\beta$  erfolgen kann, die Kinasen hier also eine redundante Funktion ausüben.

Zum anderen gibt es eine zweite, benachbarte S/T Sequenz, die jeweils drei Aminosäuren unterhalb des zentralen PPPS/TP Motivs liegt (Zeng *et al.*, 2005). Diese werden nachfolgend durch CK1- $\gamma$  Wnt-abhängig phosphoryliert (Davidson *et al.*, 2005). Diese Kinase ist durch einen Palmitoylrest an der Membran verankert. Wie jedoch die Aktivität der Kinasen GSK-3 $\beta$  und CK1- $\gamma$  reguliert wird, ist derzeit noch nicht bekannt. Nach dem Modell von Zeng *et al.* (2008) wird nach Wnt Aktivierung Dvl über die PDZ-Domäne von Frizzled an die Membran rekrutiert (Abbildung 1.4A). Dishevelled wiederum bindet über seine DIX-Domäne einen Komplex aus Axin/GSK-3 $\beta$ . Dies begünstigt die Phosphorylierung von LRP6 durch GSK-3 $\beta$  und löst die weitere Signalübertragung aus. Darüber hinaus schlagen Zeng *et al.* (2008) vor, dass phosphoryliertes LRP6 selbst Axin/GSK-3 $\beta$  Komplexe zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Phosphorylierung rekrutiert (Abbildung 1.4B).

Bedingt durch die Translokation von Axin an die Membran wird der Zerstörungskomplex destabilisiert. Hierdurch kommt es zu einer Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und schließlich zu einer Anhäufung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern, wo die Expression der Zielgene des Wnt Signalwegs induziert wird (van Noort *et al.*, 2002).



**Abb. 1.4: Modell der sequentiellen Rekrutierung und Amplifikation der Wnt induzierten LRP6 Phosphorylierung** (modifiziert nach Zeng *et al.*, 2008). (A) Initiierung. Der Wnt induzierte Fz-LRP6 Komplex fördert die initiale LRP6 Phosphorylierung durch Rekrutierung von Axin/GSK-3 $\beta$  Komplexen durch Dvl. (B) Amplifikation. Phosphoryliertes LRP6 selbst rekrutiert Axin/GSK-3 $\beta$  Komplexe zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Phosphorylierung.

Der genaue Mechanismus des nukleären Imports von  $\beta$ -Catenin ist noch ungeklärt. Da  $\beta$ -Catenin strukturell mit Importinen verwandt ist, könnte der Kernimport unabhängig vom Importin- $\beta$  vermittelten Transport erfolgen. Im Gegensatz dazu kann  $\beta$ -Catenin durch Axin oder APC aktiv aus dem Zellkern in das Zytoplasma zurück transportiert werden (Bienz, 2002; Cong & Varmus, 2004; Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Im Zellkern

In Anwesenheit eines Wnt Signals wandert  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wo es den transkriptionsreprimierenden TCF/LEF Komplex in einen –aktivierenden Komplex umwandelt. Dabei bindet die N-terminale Domäne von TCF/LEF an Armadillo-Motive des  $\beta$ -Catenins (Behrens *et al.*, 1996). So wird ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet, dessen DNA-Bindung über die HMG-Box des TCF erfolgt, während  $\beta$ -Catenin die Transaktivierungsdomäne stellt. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin führt zum einen zur Verdrängung der Korepressoren und zum anderen zur Rekrutierung von weiteren Aktivatoren zum Zielgenpromotor (Daniels & Weis, 2005). Zu diesen gehören beispielsweise das Heterodimer CBP/p300 aus *CREB-binding protein* und der Histon-Acetyltransferase p300 und BRG-1 (*Brahma-protein homolog 1*), eine Komponente des SWI/SNF (*switching-defective and sucrose nonfermenting*) Chromatin-Restrukturierungskomplexes. Diese induzieren eine Kondensation und Reorganisation des

Chromatins, so dass die Genexpression erleichtert wird (Hecht *et al.*, 2000; Barker *et al.*, 2001). Beta-Catenin kann mit dem basalen Transkriptionsapparat über TBP (*TATA Binding Protein*) oder indirekt über Pontin52 interagieren (Bauer *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2000). Bei letzterem handelt es sich um eine ATP-abhängige DNA-Helikase. Über den C-Terminus kann  $\beta$ -Catenin mit Parafibromin (menschlich) und Hyrax (*Drosophila*) interagieren, die homolog sind zum Cdc37 Protein der Hefe (Mosimann *et al.*, 2006). Dieses Protein ist eine Komponente des PAF (Polymerase assoziierter Faktor) Komplexes, der direkt mit der RNA-Polymerase II interagiert. Darüber hinaus gibt es in *Drosophila* zwei weitere transkriptionale Koaktivatoren, Legless/Bcl9 (*B-cell lymphoma*) und Pygopus, die eine wichtige Rolle spielen, indem Legless/Bcl9 als Adaptorprotein wirkt, das  $\beta$ -Catenin mit Pygopus verbindet, so dass Pygopus mit der DNA-Bindungsdomäne von TCF interagieren kann (Kramps *et al.*, 2002; Städeli & Basler, 2005).

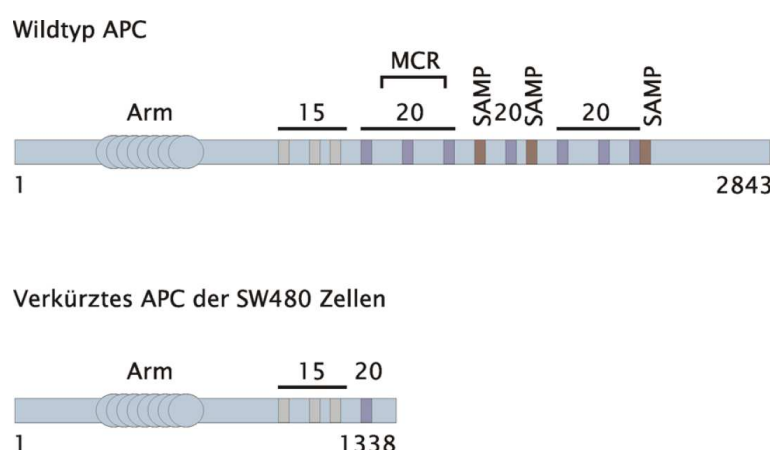
## 1.2 Der Wnt Signalweg in der Krebsentstehung

Der deregulierte Wnt Signalweg führt häufig zur Bildung von Tumoren. So finden sich bei Kolorektalkarzinomen in etwa 90% der Fälle Mutationen in Komponenten des Wnt Signalwegs (Giles *et al.*, 2003). Am häufigsten betroffen sind hierbei APC (Adenomatöse Polyposis Coli),  $\beta$ -Catenin oder Axin. Kolorektalkarzinome sind maligne Tumoren des Darmepithels von Enddarm (Rektumkarzinom) und Dickdarm (Kolonkarzinom). In Deutschland stellen sie die zweithäufigste krebisbedingte Todesursache bei Männern und Frauen dar (Statistisches Bundesamt, 2006). In fünf bis zehn Prozent der Fälle handelt es sich um vererbare Formen. Zu den häufigsten gehören zum einen das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), das auf genetischen Defekten in DNA Reparaturgenen beruht. Zum anderen gibt es die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), bei dem eine Funktionsverlustmutation in einem Allel des Tumorsuppressorgens *APC* vorliegt (Tomeo *et al.*, 1999). Die Bedeutung des Wnt Signalwegs bei der Darmkrebisentstehung wird dadurch unterstrichen, dass aktivierende Mutationen dieses Signalwegs die einzigen bekannten genetischen Veränderungen in frühen Adenomen sind (Powell *et al.*, 1992).

### 1.2.1 APC

APC ist ein klassischer Tumorsuppressor, das heißt, dass häufig beide Allele betroffen sein müssen, um die proliferationsinhibierende Funktion des Proteins aufzuheben. Allerdings wurden auch Tumoren mit einer monoallelischen Inaktivierung gefunden (Polakis, 1997). Bisher wurde von über 300 Mutationen des *APC* Gens berichtet (Laurent-Puig *et al.*, 1998). Die meisten Änderungen sind Insertionen, Deletionen oder *nonsense*-Mutationen. Die Deletion von AAAAG in Kodon 1309, welche in zehn Prozent der FAP Patienten vorliegt, ist hierbei die häufigste Mutation.

Sporadische Kolorektalkarzinome weisen in 85% der Fälle Mutationen in dem Gen auf, das APC kodiert (Laurent-Puig *et al.*, 1998). Punktmutationen treten besonders häufig in der *mutation cluster region* (MCR) des *APC* Gens auf. Diese Mutationen führen durch entstehende Stoppkodons oder Leserasterverschiebungen zu einem verkürzten Protein. Dieser trunkierten Form des APC fehlen zum größten Teil die  $\beta$ -Catenin-bindenden 20-Aminosäurewiederholungen sowie die drei Axin-Bindestellen SAMP (Schneikert & Behrens, 2007). Aufgrund dessen wird der Zerstörungskomplex nicht mehr gebildet, so dass  $\beta$ -Catenin nicht mehr gebunden und abgebaut werden kann. Dies hat einen konstitutiv aktiven Wnt Signalweg zur Folge. Die in dieser Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinie SW480 beispielsweise besitzt nur ein *APC* Allel mit einer *nonsense*-Mutation in Kodon 1338 (Smith, 1993). Diese Mutation führt zu einem verkürzten APC, das aus den Aminosäuren eins bis 1338 besteht (Abbildung 1.5).



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung des Wildtyp-APC und der verkürzten Form in SW480 Zellen (modifiziert nach Schneikert & Behrens, 2007). Arm: Armadillo-Repeat-Region, MCR: *mutation cluster region*, SAMP (Serin, Alanin, Methionin, Prolin)-Motive, 15-, 20: repetitive Motive aus 15-, 20-Aminosäuren.



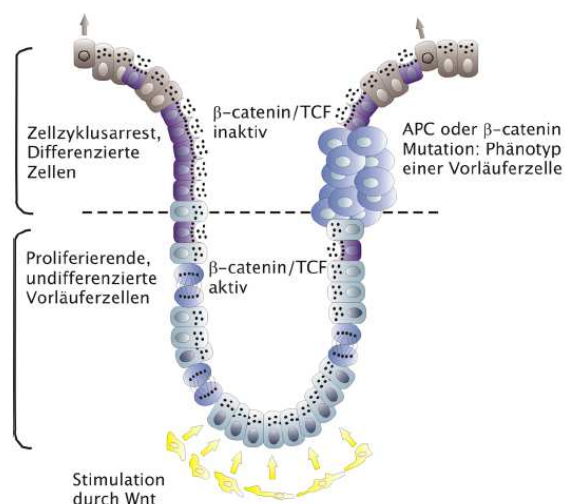
## 1.2.2 $\beta$ -Catenin

In zehn Prozent der kolorektalen Karzinome ohne *APC* Mutation liegt eine solche im *CTNNB1* Gen vor, welches  $\beta$ -Catenin kodiert (Schneikert & Behrens, 2007). Hierbei handelt es sich häufig um *missense*-Mutationen, die die konservierten Phosphorylierungsstellen des  $\beta$ -Catenins betreffen und so die Proteinstabilität erhöhen. Die in dieser Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinie HCT116 beispielsweise weist eine Deletion auf, die die Phosphorylierungsstelle Serin 45 betrifft (Brattain *et al.*, 1981). Serin 45 ist die konservierte Aminosäure, die von Casein Kinase 1 im ersten Schritt phosphoryliert wird, woraufhin die anderen Aminosäuren (Threonin 41, Serin 37 und Serin 33) durch GSK-3 $\beta$  phosphoryliert werden können.

Darüber hinaus wurden inaktivierende Mutationen im *AXIN* Gen gefunden (Polakis, 2000; Webster *et al.*, 2000). Mutationen in verschiedenen Komponenten des kanonischen Wnt Signalwegs kommen gewöhnlich nicht gemeinsam vor.

## 1.2.3 Die kolorektale Karzinogenese

Der Wnt Signalweg reguliert im Gastrointestinaltrakt die Gewebshomöostase des Darmepithels (Abbildung 1.6, links) (Pinto *et al.*, 2003). Ein Modell der Darmepithelerneuerung sowie der Polypenbildung ist in Abbildung 1.6 zu sehen. Die linke Seite zeigt den normalen Verlauf, die rechte die Folgen eines deregulierten Wnt Signalwegs.



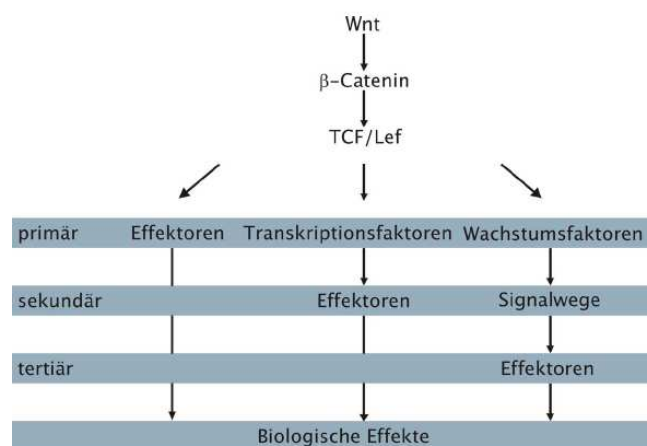
**Abb. 1.6: Modell der Polypenbildung in Darmkrypten aufgrund von Mutationen in Komponenten des Wnt Signalwegs** (modifiziert nach van de Wetering *et al.*, 2002). Auf der linken Seite ist der normale Verlauf der Darmepithelerneuerung zu sehen, rechts die Polypenbildung durch einen deregulierten Wnt Signalweg.

Die Darmschleimhaut weist eine große Anzahl an Einstülpungen auf, die so genannten Lieberkühnschen Krypten. In diesen Krypten findet die Erneuerung des Epithels statt. Dieser Prozess wird durch die genaue Koordination von Proliferation, Differenzierung und Migration reguliert (Potten & Loeffler, 1990). Im unteren Drittel der Krypte befinden sich pluripotente Stammzellen, die sich etwa alle 24 Stunden teilen. Diese intestinalen Stammzellen konnten kürzlich mit Hilfe des genetischen Markers *Lgr5* (*leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*) identifiziert werden (Barker *et al.*, 2007). Das Wnt Zielgen *Lgr5* (Maus) wird im gesunden Darmepithel ausschließlich in wenigen Zellen am Boden der Krypte exprimiert, aus denen schließlich epitheliale Zellen hervorgehen. Diese Vorläuferzellen teilen sich auf ihrem Weg in Richtung Lumen etwa alle zwölf Stunden. Im oberen Teil der Krypte differenzieren die Vorläuferzellen in einen der vier epithelialen Zelltypen, in absorbierende Enterozyten, sekretierende Becherzellen, enteroendokrine Zellen oder Paneth-Zellen, welche antimikrobielle Stoffe sezernieren (Sancho *et al.*, 2003). Letztere wandern im Gegensatz zu den anderen Zelltypen zum Boden der Krypte, wo sie etwa 20 Tage verweilen. An der epithelialen Oberfläche durchlaufen die anderen Zelltypen die Apoptose und werden in das Lumen abgegeben. Der gesamte Prozess der Zellwanderung vom Boden zur Oberfläche der Krypte benötigt drei bis fünf Tage (Potten & Loeffler, 1990). Auf diese Weise wird das Darmepithel des Menschen etwa alle fünf Tage erneuert (Pinto & Clevers, 2005). Nach einem Modell von van de Wetering *et al.* (2002) wird die Proliferation der Stammzellen und Vorläuferzellen im unteren Teil der Krypte durch Wnt Proteine induziert, die vermutlich von umliegenden mesenchymalen Zellen sekretiert werden. Somit weisen die Zellen in diesem Bereich einen aktiven Wnt Signalweg auf und proliferieren entsprechend. Auf ihrem Weg zur Oberfläche der Krypte entfernen sich die Zellen vom Wnt Signal, so dass der Signalweg in diesen Zellen inaktiv ist. Die Zellteilung wird gestoppt und die Zellen beginnen zu differenzieren. Liegen jedoch Mutationen in Komponenten des Wnt Signalwegs vor, die zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führen, sind die Zellen unabhängig von einem externen Wnt Signal (Abbildung 1.6, rechts). Dies hat zur Folge, dass sich die Zellen weiterhin teilen statt zu differenzieren, auch noch wenn sie die Oberfläche der Krypte erreicht haben. Durch die vermehrte Proliferation kann es zur Polypenbildung kommen. Somit hat der Wnt Signalweg in Darmkrypten eine zentrale Funktion als Schalter zwischen Proliferation und Differenzierung der Zellen. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Wnt Zielgen *c-Myc* (Maus), da es die Proliferation der Stammzellen und Vorläuferzellen stimuliert, indem es *CDKN1A* (Mensch) reprimiert. p21, das Produkt dieses Gens, bewirkt

einen Zellzyklusarrest und begünstigt so die Differenzierung der Zellen (van de Wetering *et al.*, 2002).

### 1.3 Zielgene des Wnt Signalwegs

Der kanonische Wnt Signalweg kontrolliert unterschiedliche Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose durch Regulation einer Vielzahl von Zielgenen. Für eine Liste ausgewählter Zielgene und Ergebnisse verschiedener *Microarray* Analysen siehe <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>. Die identifizierten Zielgene lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: Gene zur Rückkopplungskontrolle, Proliferation, Apoptose, Zelladhäsionsmoleküle und Gene zur Regulation anderer zellulärer Prozesse, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren. Außerdem wird zwischen direkt und indirekt regulierten Wnt Zielgenen unterschieden (Willert *et al.*, 2002; Lustig & Behrens, 2003; Ziegler *et al.*, 2005). Direkt regulierte beziehungsweise primäre Zielgene zeichnen sich durch ein oder mehrere TCF/LEF Bindungsmotive in den Promotorregionen aus. Dagegen werden indirekte beziehungsweise sekundäre Zielgene durch die primären reguliert. Hieraus ergeben sich drei Ebenen des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene (Abbildung 1.7).



**Abb. 1.7:** Die drei Ebenen des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene (modifiziert nach Vlad *et al.*, 2008).

In der primären Ebene werden direkte Zielgene des Wnt Signalwegs durch TCF/LEF reguliert. Hierzu gehören Effektoren, zum Beispiel das proteolytische Enzym MMP-7 (Matrix Metalloprotease-7) (Brabletz *et al.*, 1999), Transkriptionsfaktoren wie c-Myc (He *et al.*, 1998) oder Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die andere Signalwege regulieren (Zhang *et al.*, 2001). Die sekundäre Ebene weist zum einen Effektoren wie p21 auf, die durch direkte Wnt Zielgene wie c-Myc reguliert werden (Gartel

*et al.*, 2001). Zum anderen aber auch Ziel-Signalwege, wie zum Beispiel den durch VEGF aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase Signalweg. In der dritten Ebene sind Zielgene dieser Ziel-Signalwege zu finden, zum Beispiel das VEGF Zielgen *DSCR1* (*Down Syndrome critical region protein 1*) (Hesser *et al.*, 2004). Bei den Wnt Zielgenen handelt es sich meist nicht um universelle Zielgene. Der zelluläre Kontext spielt hierbei eine wichtige Rolle. So wird angenommen, dass die Wnt Antwort auf transkriptionaler Ebene vom Zelltyp und der jeweiligen Entwicklungsgeschichte der Zelle abhängt und nur in zweiter Linie durch die Natur des Wnt Signals bestimmt wird (Clevers, 2006). Erst durch eine fein abgestimmte Zellantwort ist der Wnt Signalweg in der Lage in verschiedenen Geweben auf unterschiedliche Prozesse Einfluss zu nehmen. Diese Zellantwort besteht neben der Wnt Konzentration und den vorhandenen Wnt Rezeptoren auf der Zelle auch aus der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, -aktivatoren und -repressoren sowie aus autoregulatorischen Mechanismen des Signalwegs. Zu den wenigen universell regulierten Zielgenen des Wnt Signalwegs werden bisher *Conductin/Axin2* (Jho *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002) und *SP5* (Weidinger *et al.*, 2005) gezählt (Clevers, 2006). Im Folgenden werden drei primäre Wnt Zielgene vorgestellt, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

### 1.3.1 Cyclin D1

Das Cyclin D1 Gen *CCND1* ist in 15% der Brustkrebsfälle amplifiziert und in 30-50% überexprimiert. In den meisten Krebsarten wie etwa Lungen-, Brust-, und Darmkrebs resultiert die Überexpression von Cyclin D1 aus der Fehlregulation eines onkogenen Signals und nicht in einer Mutation oder einer Translokation des Cyclin D1 Gens selbst (Hosokawa & Arnold, 1998).

Cyclin D1-defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber einige Entwicklungsstörungen in spezifischen Geweben, wie zum Beispiel Retina, Nervensystem und Brustdrüsenepithelium (Sicinski *et al.*, 1995). Bei letzterem zeigt sich eine wichtige Beeinträchtigung in der Proliferation während der Schwangerschaft Cyclin D1-defizienter Mäuse (Fantl *et al.*, 1995; Sicinski *et al.*, 1995). Dies deutet auf eine besondere Rolle von Cyclin D1 in der Zellteilung der Brustdrüsenepithelzellen hin. Darüber hinaus sind *Ccnd1*<sup>-/-</sup> Mäuse kleiner als Wildtyp Mäuse (Fantl *et al.*, 1995).

*CCND1* wurde in verschiedenen Systemen als direktes Zielgen des Wnt Signalwegs beschrieben, darunter in humanen kolorektalen Krebszellen (Tetsu & McCormick, 1999; Shtutman *et al.*, 1999) und humanen Teratokarzinomzellen (Willert *et al.*, 2002). Andere

Studien konnten dies dagegen nicht bestätigen (van de Wetering *et al.*, 2002; Sansom *et al.*, 2004; Sansom *et al.*, 2005; Andreu *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *CCND1* neben dem Wnt Signalweg durch andere Wachstumsfaktoren und Hormone reguliert wird. Der *CCND1* Promotor beinhaltet eine Vielzahl an Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel AP-1 (*activator protein-1*) (Dufourny *et al.*, 2000; Shiozawa *et al.*, 2004), STATs (*signal transducer and activator of transcription*) (Bromberg *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 1999), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) (Guttridge *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 1999), SP-1 (Sp1 Transkriptionsfaktor), CRE (*cAMP-responsive element*) (Castro-Rivera *et al.*, 2001) und TCF (Tetsu & McCormick, 1999). Der epidermale Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) aktiviert die Transkription von *CCND1* durch Proteine der AP-1 Familie (Dufourny *et al.*, 2000), ebenso wie Estradiol, das neben den Transkriptionsfaktoren CRE und SP-1 (Castro-Rivera *et al.*, 2001) ebenfalls Proteine der AP-1 Familie nutzt (Shiozawa *et al.*, 2004). Hierbei spielt jedoch die Zusammensetzung des AP-1 Komplexes eine große Rolle. Beispielsweise inhibiert junB die Aktivität des *CCND1* Promotors, während c-jun die Transkription aktiviert (Bakiri *et al.*, 2000). Der Wachstumsfaktor IGF-1 (*insulin like growth factor*) aktiviert *CCND1* durch NF- $\kappa$ B (Joyce *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die GTPase Ras (*Rat sarcoma*) die Transkription von *CCND1* durch die Bindestellen von CREB (Tetsu & McCormick, 1999) und NF- $\kappa$ B (Joyce *et al.*, 1999) erhöht.

Das Cyclin D1 Protein hat in Fibroblasten nur eine sehr kurze Halbwertszeit von 20 Minuten (Coqueret, 2002). Direkt nach der Synthese wird es ubiquitiniert und so für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet (Yu *et al.*, 1998; Russel *et al.*, 1999). Somit ist die konstitutive Degradation des Proteins ein Mechanismus der Cyclin D1 Regulation und dient dem schnellen Abschalten der Proliferation (King *et al.*, 1996; Koepf *et al.*, 1999). Ein zweiter Mechanismus der Cyclin D1 Regulation ist die Phosphorylierung der konservierten Aminosäure Threonin 286 durch die Kinase GSK-3 $\beta$ . Dies bewirkt eine Translokation des Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo es schließlich abgebaut wird (Diehl *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  ist Ras-abhängig, so dass Ras nicht nur die Transkription von *CCND1* aktiviert (Albanese *et al.*, 1995), sondern darüber hinaus das Cyclin D1 Protein vor der Degradation schützt (Lavoie *et al.*, 1996; Diehl *et al.*, 1998). Außerdem trägt ein weiterer Threoninrest (Thr 288) zur Degradation von Cyclin D1 bei, indem dieser durch die Kinase DYRK1B (*dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1B*) phosphoryliert wird (Zou *et al.*, 2004).

Cycline spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus, indem sie über ein Sequenzmotiv, der Cyclin-Box, mit verschiedenen CDKs (*cyclin dependent kinases*) Komplexe bilden (Morgan, 1997; Liu *et al.*, 2004). Der Zellzyklus ist ein universeller Prozess, bei dem sich Zellen teilen und am Wachstum und an der Entwicklung des Organismus teilnehmen (Nurse, 2000). Im Verlauf des Zellzyklus bleibt der Gehalt der CDKs konstant, während die Expression der Cycline, bedingt durch transkriptionale und posttranskriptionale Regulationen, variiert. So werden die verschiedenen CDKs nur aktiviert, wenn das entsprechende Cyclin in ausreichender Menge vorhanden ist. Eine unkontrollierte CDK Aktivierung spielt häufig eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Krankheiten, unter anderem in der Krebsentstehung (Sherr, 1996; Hanahan & Weinberg, 2000). Cyclin D1 kann sowohl an CDK4 als auch an CDK6 binden (Morgan, 1995) und ist wichtig für das Fortschreiten der G<sub>1</sub>-Phase (Matsushime *et al.*, 1991; Motokura *et al.*, 1991; Xiong *et al.*, 1991). Die Aktivierung der Cyclin D1/CDK4 und Cyclin D1/CDK6 Komplexe erfolgt durch CAK (*CDK-activating kinase*) vermittelte Phosphorylierung, was zur Translokation der Komplexe in den Zellkern führt (Matsuoka *et al.*, 1994). Bei Cyclin D1 handelt es sich um die zentrale Verbindung zwischen Mitogenen und dem Zellzyklus, da seine Expression von extrazellulären Signalen und Signalkaskaden abhängig ist (Coqueret, 2002). Eine wichtige Funktion von Cyclin D1 zusammen mit CDK4 und CDK6 im Zellzyklus ist die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb). Rb ist die zentrale Komponente eines Repressionskomplexes, der die Transkription vieler Gene inhibiert, deren Produkte für den Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase sowie für die S-Phase selbst notwendig sind (Harbour & Dean, 2000). Die Aktivierung dieser Gene, zu denen unter anderem *CCNE* (kodiert Cyclin E) gehört, wird durch E2F Transkriptionsfaktoren reguliert (Ohtani *et al.*, 1995; Geng *et al.*, 1996; Le Cam *et al.*, 1999). Hypophosphoryliertes Rb ist in der Lage an E2F Transkriptionsfaktoren zu binden (Dyson, 1998; Harbour & Dean, 2000) und deren transkriptionale Aktivität in der G<sub>1</sub>-Phase zu inhibieren, so dass Gene der S-Phase nur aktiviert werden, wenn E2F durch Phosphorylierung von Rb befreit wird (Flemington *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993). Der Phosphorylierungsstatus von Rb wiederum wird durch Cyclin D1/CDK4 und Cyclin D1/CDK6 Komplexe reguliert. Aufgrund dieser initialen Phosphorylierung werden weitere Phosphorylierungen durch Cyclin E/CDK2 Komplexe ermöglicht (Harbour *et al.*, 1999). So sind die Cyclin D1/CDK4 und Cyclin D1/CDK6 Komplexe in mehrfacher Hinsicht wichtig für die Regulation von Cyclin E und damit für die weitere Progression der S-Phase. Auf der einen Seite ermöglichen die Komplexe Cyclin E den Zugang zu Rb und so dessen weitere Phosphorylierung, auf der anderen Seite sind sie

maßgeblich an der Aufhebung der Reprimierung von *CCNE* beteiligt (Zhang *et al.*, 2000). Darüber hinaus dienen Cyclin D1/CDK4 und Cyclin D1/CDK6 in einer nicht-katalytischen Funktion dazu, CDK-inhibierende Proteine wie p21 und p27<sup>Kip</sup> zu binden und sie so von Cyclin E/CDK2 Komplexen zu entfernen (Perez-Roger *et al.*, 1999; Sherr & Roberts, 1999). Des Weiteren gibt es einige CDK4- und CDK6-unabhängige Funktionen von Cyclin D1. So wurde gezeigt, dass Cyclin D1 verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert, indem es an diese bindet und so ihre transkriptionale Aktivität inhibiert. Hierzu gehören SP1 (Opitz & Rustgi, 2000), DMPI (*cyclin D-binding myb-like protein 1*) (Inoue & Sherr, 1998), STAT3 (Bienvenu *et al.*, 2001) und C/EBP $\beta$  (*CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$* ) (Lamb *et al.*, 2003). Auch nukleäre Rezeptoren, die in ihrer Liganden-gebundenen Form als Transkriptionsfaktoren wirken, wie zum Beispiel der Estrogen Rezeptor (Zwijssen *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 2000), der Androgen Rezeptor (Knudsen *et al.*, 1999; Petre *et al.*, 2002), PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) (Wang *et al.*, 2003) und der Thyroid Hormon Rezeptor (Lin *et al.*, 2002) werden durch Cyclin D1 reguliert. Im Gegensatz zu den anderen aufgeführten Rezeptoren wird der Estrogen Rezeptor von Cyclin D1 aktiviert und nicht reprimiert (Zwijssen *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 1997). Ebenfalls CDK-unabhängig scheint der Einfluss von Cyclin D1 auf die Migration von Zellen zu sein. So zeigen Makrophagen von *Ccnd1*<sup>-/-</sup> Mäusen eine stärkere zelluläre Adhäsion und somit Beeinträchtigungen in der zellulären Migration gegenüber Makrophagen aus Wildtyp Mäusen (Neumeister *et al.*, 2003). Der pro-migratorische Effekt von Cyclin D1 liegt hier in der Inhibierung von ROCK2 (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2*) und des Metastasesuppressors TSP1 (Thrombospondin-1), die beide die Migration von Zellen inhibieren (Li *et al.*, 2006a). Zu den Substraten von ROCK zählen die Kinasen MLC (*myosin light chain*) und LIM, deren jeweilige Aktivierung zu der Ausbildung von Stressfasern und einer somit geringeren Migrationsrate führt (Li *et al.*, 2006a). Ein weiterer Effekt von Cyclin D1 wurde kürzlich von Sakamaki *et al.* (2006) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Cyclin D1 sowohl die Funktion als auch die Größe von Mitochondrien beeinflusst. Mitochondrien sind Vermittler vieler metabolischer Signale und produzieren in der Atmungskette ATP durch die Kopplung des Elektronentransports mit Protonenpumpen (Green & Reed, 1998). Andere metabolische Aktivitäten sind zum Beispiel Hämsynthese, Fettsäuremetabolismus und Zitronensäurezyklus. Als Folge der Atmungskette entstehen freie Radikale, die zur Schädigung der mitochondrialen DNA führen. Das Altern und die Tumorentstehung sind mit solchen Mutationen der mitochondrialen DNA verbunden, so dass die Aktivität und Funktion der Mitochondrien als potentielles Ziel in der Krebstherapie gilt (Costantini *et al.*,

2000). Die Cyclin D1 abhängige Inhibierung der mitochondrialen Aktivität wurde unter anderem durch *Microarray* Analysen untersucht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cyclin D1 die Transkription wichtiger Gene der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus hemmt, darunter *HK2* (kodiert Hexokinase-2), *PDHB* (kodiert Pyruvat Dehydrogenase  $\beta$ ) und *NDUFVI* (kodiert NADH Dehydrogenase Ubiquinon Flavoprotein 1) (Sakamaki *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang könnte Cyclin D1 dazu dienen Wachstumsfaktorsignale auch in Energie- und Biosyntheseprozesse einzubinden.

### 1.3.2 c-Myc

Das Protoonkogen *c-MYC* wurde ursprünglich als zelluläres Homolog des Onkogens *v-myc* des Myelocytomatox Retrovirus entdeckt (Vennstrom *et al.*, 1982). Eine abweichende Regulation von *c-Myc* ist in vielen humanen Krebserkrankungen zu finden und ist häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert (Pelengaris *et al.*, 2002a). Zu den häufigsten Krebserkrankungen gehören beispielsweise Brust-, Darm- und Gebärmutterhalskrebs sowie Melanome (Dang, 1999; Nesbit *et al.*, 1999; Schlagbauer-Wadl *et al.*, 1999; Munzel *et al.*, 1991). Die Bedeutung von *c-Myc* wird ebenfalls durch Studien von *Myc*<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich. Die homozygote Mutation ist zwischen Tag 9,5 und 10,5 der embryonalen Entwicklung letal (Davis *et al.*, 1993). Die Embryonen sind kleiner und zeigen Abnormalitäten in der Entwicklung von Herz, Perikard und Neuralrohr. Heterozygote weibliche Mäuse zeigen vor allem Defekte in der Fertilität (Davis *et al.*, 1993). Der *c-Myc* Proteingehalt einer Zelle ist auf verschiedenen Ebenen reguliert, sowohl transkriptional (Initiation und Elongation) und posttranskriptional (mRNA Stabilität und Translation), als auch posttranslational (Proteinstabilität) (Luscher & Eisenman, 1990; Kelly *et al.*, 1983; Jones & Cole, 1987; Sears *et al.*, 1999).

*c-MYC* wurde als erstes Zielgen des Wnt Signalwegs in menschlichen Kolonkarzinomzellen nachgewiesen (He *et al.*, 1998). Im Promotor von *c-MYC* wurden dabei TCF-4 Bindungsstellen identifiziert und die Aktivierung des Gens konnte durch Transfektion von dominant-negativem TCF aufgehoben werden. Eine Vielzahl von extrazellulären und intrazellulären Signalkaskaden sind neben dem Wnt Signalweg an der Regulation von *c-Myc* beteiligt. Dies sind zum Beispiel die MAPK (*mitogen activated protein kinases*) (Desbiens *et al.*, 2003; Iavarone *et al.*, 2003; Kerkhoff *et al.*, 1998), PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Grumont *et al.*, 2002; Watnick *et al.*, 2003) und STAT (Kiuchi *et al.*, 1999) Signalwege. Eine vermehrte Expression des *c-Myc* Proteins ist an beinahe jedem Aspekt der



Tumorentstehung beteiligt (Pelengaris *et al.*, 2002b). Zum einen hat c-Myc die Fähigkeit Zellproliferation zu fördern (Eilers *et al.*, 1991) und Zelldifferenzierung zu inhibieren (Freytag & Geddes, 1992). Zum anderen führt eine deregulierte Expression von c-Myc zu vermehrtem Zellwachstum (Iritani & Eisenman, 1999; Johnston *et al.*, 1999), reduzierter Zelladhäsion (Arnold & Watt, 2001; Frye *et al.*, 2003), vermehrter Metastasierung (Pelengaris *et al.*, 2002b) und Angiogenese (Baudino *et al.*, 2002) sowie zu genomischer Instabilität (Felsher & Bishop, 1999). Unter physiologischen Bedingungen wird c-Myc in schnell proliferierendem Gewebe exprimiert wie beispielsweise Haut und Darm (Pelengaris *et al.*, 2002a). Der Transkriptionsfaktor c-Myc aktiviert seine Zielgene als Teil eines heterodimeren Komplexes mit dem Partnerprotein Max (*Myc associated factor x*). Die Bindung von Max erfolgt am C-Terminus über eine bHLHZ (*basic-helix-loop-helix-zipper*) Domäne. Das so entstehende Heterodimer erkennt spezifisch die E-Box (*enhancer box*) DNA-Sequenz CACGTG (Blackwood & Eisenman, 1991). Homodimere von Max binden ebenfalls an E-Box Sequenzen, jedoch haben sie auf diese weder eine aktivierende noch eine reprimierende Wirkung. Eine Reprimierung der Transkription erfolgt, wenn Max Komplexe mit Proteinen der Mad (*Max dimerization*) Familie oder Mnt (*Max-interacting protein*) bildet (Adhikary & Eilers, 2005). Die N-terminale Domäne von c-Myc enthält zwei konservierte Elemente, die Myc Boxen I und II (MBI und MBII), welche für die Transaktivierung der Zielgene wichtig sind. So interagieren beispielsweise die Proteine TRRAP (*transformation/transcription domain-associated protein*) und TIP48 beziehungsweise TIP49 mit MBII. Diese Proteine sind in der Umgestaltung von Chromatin involviert. TRRAP ist Teil eines Komplexes mit Histon-Acetyltransferase Aktivität, während TIP48 beziehungsweise TIP49 eine ATP-hydrolysierende und eine Helikase Aktivität besitzen. Außerdem kann c-Myc ebenfalls als transkriptionaler Repressor wirken, wenn es mit Miz1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) interagiert (Adhikary & Eilers, 2005). Freies Miz1 aktiviert die Transkription durch Rekrutierung der p300 Histonacetyltransferase. Myc-Max Heterodimere binden an Miz1 und verhindern die Transaktivierung, indem sie zum einen die Bindung von p300 an Miz1 verhindern und zum anderen die DNA Methyltransferase DNMT3a (DNA Methyltransferase 3a) rekrutieren. Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass Myc-Max Komplexe, nicht aber Mad-Max Komplexe zu Tetrameren dimerisieren und so eine größere Plattform für Protein-Protein Interaktionen am C-Terminus von c-Myc bieten (Nair & Burley, 2003).

Die zentrale Funktion von c-Myc liegt in der Progression des Zellzyklus (Nesbit *et al.*, 1999; Eilers, 1999; Amati, 2001). In ruhenden Zellen ist c-Myc kaum zu finden, jedoch steigt nach

Stimulation der entsprechende mRNA- und Proteingehalt sehr schnell an, so dass die Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase eintreten. Danach sinkt der c-Myc Spiegel auf einen niedrigen aber gleich bleibenden Wert (Pelengaris *et al.*, 2002b). Den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase erreicht c-Myc durch Genaktivierung und –reprimierung. So induziert c-Myc früh in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus die Aktivität der Cyclin E/CDK2 Komplexe (Steiner *et al.*, 1995; Berns *et al.*, 1997), indem es die Transkription von *CCND2* (kodiert Cyclin D2) und *CDK4* aktiviert (Coller *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Hermeking *et al.*, 2000). Dies führt dazu, dass der Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> von Cyclin D2/CDK4 Komplexen gebunden wird und so nicht mehr mit Cyclin E/CDK2 interagieren und diesen Komplex inhibieren kann (Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999). In der anschließenden Degradation von p27<sup>Kip1</sup> sind zwei weitere c-Myc Zielgene involviert, *CUL-1* (*cullin-1*) und *CKS* (*CDC28 protein kinase regulatory subunit*) (Coller *et al.*, 2000; O'Hagan *et al.*, 2000a). Darüber hinaus fördert c-Myc die Progression des Zellzyklus durch Reprimierung der CDK Inhibitoren p15<sup>INK4B</sup> und p21, die im Zellzyklusarrest eine große Rolle spielen. Für die Reprimierung von *CDKN1A* wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Zum einen erfolgt sie wie bei p15<sup>INK4B</sup> über die Interaktion mit Miz1, das an den jeweiligen Promotor bindet. Dabei wird die Transkriptionsaktivierung durch den oben beschriebenen Mechanismus inhibiert (Wu *et al.*, 2003; Staller *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005). Zum anderen kann c-Myc die Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3 binden und hemmen (Gartel *et al.*, 2001). Darüber hinaus führt ein aktiver Wnt Signalweg zur Hemmung des *CDKN1A* Promotors (Kamei *et al.*, 2003). Somit handelt es sich bei p21 sowohl um ein direktes als auch um ein indirektes Zielgen des Wnt Signalwegs.

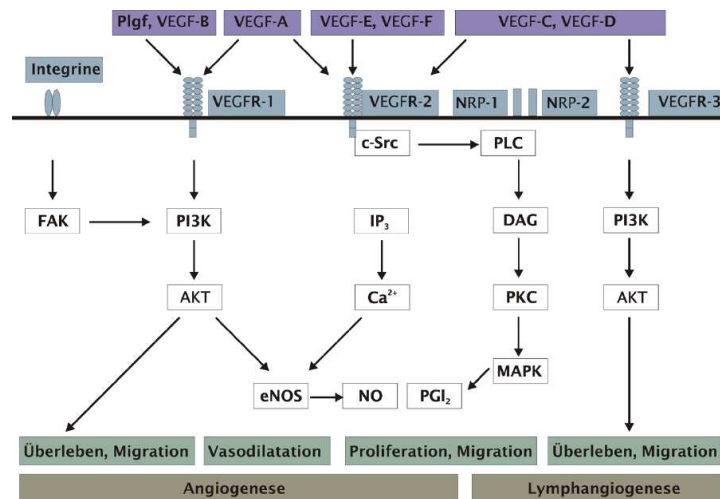
Die deregulierte Expression von c-Myc allein führt für gewöhnlich nicht zur Entstehung von Tumoren. Häufig kooperiert c-Myc mit Onkogenen des Ras Signalwegs, was zu zellulärer Transformation und Tumorentstehung führt (Land *et al.*, 1983; Drayton *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003). Ras kontrolliert die Funktion von c-Myc unter anderem durch den MAPK Signalweg, indem es dessen Stabilität durch Phosphorylierung von Threonin 58 und Serin 62 reguliert (Sears *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung des Ser 62 durch MAPK wirkt stabilisierend, während die von Thr 58 c-Myc destabilisiert und die Dephosphorylierung von Ser 62 erleichtert. Threonin 58 wird durch GSK-3 $\beta$  phosphoryliert (Gregory & Hann, 2003), dessen Aktivität Ras durch den PI3K Signalweg inhibiert. Dadurch wirkt Ras stabilisierend auf c-Myc. Die E3 Ubiquitin-Ligase SCF<sup>FBW7</sup> (SKP1-Cullin-F-Box-Protein; *F-box and wd40 domain protein 7*) erkennt phosphoryliertes Thr 58, ubiquitiniert c-Myc und markiert es so für den proteasomalen Abbau (Welcker *et al.*, 2004a; Welcker *et al.*,

2004b; Yada *et al.*, 2004). Die Inaktivierung von c-Myc kann zur Aufhebung der Tumorentstehung führen (Shachaf & Felsher, 2005). Dabei kommt es zum Proliferationsstopp, zellulärer Differenzierung und/oder zur Apoptose der Tumorzellen. Zielgene von c-Myc sind in verschiedene Prozesse involviert, wie etwa Proliferation, Proteinsynthese, Zelladhäsion, Angiogenese und Stoffwechsel (Lee & Dang, 2006). Für eine detaillierte Übersicht über die c-Myc Zielgene siehe <http://www.myc-cancer-gene.org>. Ein gut untersuchtes c-Myc-Zielgen ist *TFRC*, das den Transferrin Rezeptor (TfR) kodiert. Bei diesem handelt es sich um ein glykosyliertes Transmembranprotein (O'Donnell *et al.*, 2006), das in der Zelle als Homodimer die Aufnahme von Eisen gebundenem Transferrin durch Rezeptor vermittelte Endozytose reguliert (Cheng *et al.*, 2004). Die Menge von TfR wird vor allem auf posttranskriptionaler Ebene durch die Eisenkonzentration in einer Zelle reguliert. Außerdem spielt TfR ebenfalls eine große Rolle in der Proliferation von Zellen (Daniel *et al.*, 2006). Die Menge der TfR Moleküle auf der Zelloberfläche korreliert mit der Proliferationsrate einer Zelle, so dass in Krebszellen häufig eine erhöhte *TFRC*-Expression detektiert wird (Gatter *et al.*, 1983; Richardson, 2002; Daniels *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass c-Myc über seine Zielgene die aerobe Glykolyse fördert, beispielsweise durch Aktivierung von *HK2* (Kim *et al.*, 2004a). Zielgene, die in der Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen, sind zum Beispiel *TSP1* (kodiert Thrombospondin-1) (Tikhonenko *et al.*, 1996; Dang *et al.*, 1999; O'Hagan *et al.*, 2000b; Menssen & Hermeking, 2002) und *ROCK1* (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*) (Louro *et al.*, 2002). Thrombospondin-1 ist ein extrazelluläres Matrixglykoprotein, das als erster natürlicher Inhibitor der Angiogenese entdeckt wurde (Good *et al.*, 1990). Es wird von verschiedenen Onkogenen reprimiert, darunter Ras, c-Myc und c-Jun (Volpert *et al.*, 2002). Watnick *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Reprimierung von *TSP1* vom c-Myc Phosphorylierungsstatus abhängt und nicht vom absoluten c-Myc Gehalt. Ein weiteres Zielgen von c-Myc, das eine positive Rolle in der Angiogenese spielt und von c-Myc reprimiert wird, ist *VEGF* (Barr *et al.*, 2000; Baudino *et al.*, 2002).

### 1.3.3 VEGF

Die VEGF Familie besteht aus den Mitgliedern VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F und Plgf (*placenta growth factor*). Sie alle teilen ein Sequenzmotiv aus acht konservierten Cysteinresten, unterscheiden sich aber in ihren physikalischen und biologischen Eigenschaften. So binden sie an die verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 (VEGF Rezeptor-1), VEGFR-2 und VEGFR-3. Die Rezeptoren Neuropilin-1 (NRP-1) und -

2 (NRP-2) können ebenfalls mit einigen Mitgliedern der VEGF Familie interagieren. Die VEGF Familie spielt in der embryonalen Entwicklung und in physiologischen und pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle, darunter Wundheilung, rheumatoide Arthritis, Neovaskularisierung des Auges, Tumorentwicklung und kardiovaskuläre Erkrankungen (Roy *et al.*, 2006). VEGF-A ist ein Schlüsselmolekül der Angiogenese und Vaskulogenese und ist in der Proliferation, der Bildung endothelialer Fortsätze (*Sprouting*), der Migration und der Gefäßbildung (*Tube Formation*) endothelialer Zellen (Ferrara *et al.*, 2003) involviert. Es ist ein homodimeres Glykoprotein, das aus zwei identischen 23 kDa Untereinheiten besteht (Ferrara & Henzel, 1989). Durch alternatives *Splicing* existieren sechs verschiedene VEGF-A Isoformen von unterschiedlicher Größe (121, 145, 165, 183 und 206 Aminosäuren), wobei es sich bei den kürzeren VEGF-A121 und VEGF-A145 um sekretierte und bei den längeren VEGF-A183 und VEGF-A206 um membrangebundene Isoformen handelt (Roy *et al.*, 2006). VEGF-A165 existiert als membrangebundene sowie als freie Form, wenn der Membrananker durch Plasmin oder Matrix Metalloproteasen gespalten wird (Ho & Kuo, 2007). Darüber hinaus ist es die häufigste Isoform und hauptsächlich für die VEGF-A zugeschriebenen Effekte verantwortlich (Ferrara *et al.*, 2003; Tammela *et al.*, 2005). Untersuchungen von homozygoten *Vegfa*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass die Mutation zwischen Tag acht und neun embryonal letal wirkt. Sogar Mäuse, denen nur ein *Vegfa* Allel fehlt, sterben zwischen E11 und E12 (Ferrara *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 2003; Tammela *et al.*, 2005). Somit scheint VEGF-A in der Embryogenese eine essentielle Bedeutung zuzukommen. VEGF-A bindet hauptsächlich an die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2, aber es kann ebenfalls mit den Rezeptoren Nrp-1 und Nrp-2 interagieren (Klagsbrun *et al.*, 2002). Die Aktivierung von VEGFR-2 ist dabei verantwortlich für die meisten Aktivitäten von VEGF-A, einschließlich der Permeabilität der endothelialen Zellen, Proliferation, Migration und Überleben (Ho & Kuo, 2007), obwohl VEGF-A mit einer größeren Affinität an VEGFR-1 (Kd ~10-20 pmol/l) bindet als an VEGFR-2 (Kd ~75-125 pmol/l) (DeVries *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass VEGFR-1 die Aktivität von VEGFR-2 negativ reguliert, indem es mit diesem um VEGF-A konkurriert (Fong *et al.*, 1995; Ho & Kuo, 2007). Bei der Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinase. Dies wiederum hat die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zur Folge (Abbildung 1.8). Der Rezeptor Nrp-1, dem die Tyrosinkinase Domäne fehlt, wirkt hierbei als Korezeptor und verstärkt die Bindung von VEGF-A (Soker *et al.*, 1998).



**Abb. 1.8: Signalwege und biologische Funktionen von VEGF** (modifiziert nach Roy *et al.*, 2006). VEGFR-2 und VEGFR-3 sind die häufigsten Rezeptoren endothelialer Zellen der Blut- beziehungsweise Lymphgefäße. PI3K/Akt, MAPK, Ca<sup>2+</sup> und NO sind wichtig für die Effekte von VEGFR-2. Der PI3K/Akt Signalweg führt zur Phosphorylierung von Bad und Caspase 9 (apoptotische Proteine) und eNOS, wodurch das Überleben der Zelle erhöht wird. Der pro-migratorische Effekt wird zusammen mit Integrinen durch FAK oder PLC vermittelt. AKT: *anti-apoptotic kinase*; DAG: Diacylglycerol; eNOS: *endothelial constitutive nitric oxide synthase*; FAK: *focal adhesion kinase*; IP<sub>3</sub>: IP<sub>3</sub>-Inositol 1,4,5-Trisphosphat; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; NO: *nitric oxide*; NRP: Neuropilin; PGI<sub>2</sub>: Prostazyklin; PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*; Plgf: *placenta growth factor*; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Expression, Verfügbarkeit und Aktivität von VEGF-A wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, einschließlich Hypoxie, Transkriptionsfaktoren, entzündungsvermittelnde Mediatoren, deregulierte Onkogene und Tumorsuppressoren sowie physikalische Einflüsse (Ho & Kuo, 2007). Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie beispielsweise in großen Tumoren herrschen, dimerisiert HIF (*hypoxia-inducible factor*)-1 $\alpha$  mit HIF-1 $\beta$  und formt einen Transkriptionsfaktor, der an *hypoxic response elements* (HRE) in der Promotor Region des *VEGFA* Gens bindet, was eine Erhöhung der *VEGFA* Transkription zur Folge hat. Im Gegensatz dazu wird HIF-1 $\alpha$  unter normalen Bedingungen an zwei Prolinen (Pro 402 und Pro 564) hydroxyliert, was die Interaktion mit dem VHL (von Hippel-Lindau) Protein fördert. VHL ist Teil einer E3 Ubiquitin-Ligase, die HIF-1 $\alpha$  für den proteasomalen Abbau markiert (Tammela *et al.*, 2005; Mole *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es andere, HIF-1 $\alpha$  unabhängige Signalwege, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von VEGF-A in der Krebsentstehung spielen. Zum einen führt Ras über AP-1 Konsensussequenzen im *VEGFA* Promotor zu einer Erhöhung der Transkription (Eferl & Wagner, 2003). Zum anderen enthält *VEGFA* sieben  $\beta$ -Catenin/TCF Bindestellen im Promotorbereich, wodurch es als Zielgen des Wnt Signalwegs in Kolonkarzinomen vermehrt

exprimiert wird (Zhang *et al.*, 2001; Easwaran *et al.*, 2003). Eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind ebenfalls an der Regulation von VEGF-A beteiligt (Ben-Av *et al.*, 1995; Neufeld *et al.*, 1999). Auch Zug- und Scherkräfte haben einen Einfluss auf die Transkription von *VegfA* (Egginton *et al.*, 2001). Ein Teil von sekretiertem VEGF-A bleibt membrangebunden an der extrazellulären Matrix und wirkt dort vermutlich als Reserve an Wachstumsfaktoren, die durch Spaltung mittels Plasmin oder Matrix Metalloproteasen freigesetzt werden können (Houck *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigen jedoch, dass durch Plasmin gespaltene VEGF Fragmente zwar aktiv sind, jedoch nur eine geringe mitogene Aktivität in der Wundheilung aufweisen (Eming & Krieg, 2006). Überexpression von VEGF-A führt in verschiedenen Geweben zu einer ausgeprägten Angiogenese, allerdings sind die entstehenden Gefäße häufig groß, erweitert und unspezifisch durchlässig (Rissanen *et al.*, 2003; Bhardaj *et al.*, 2003; Rissanen *et al.*, 2004). Auch wenn zunächst davon ausgegangen wurde, dass VEGF hauptsächlich in der Neubildung von Blutgefäßen involviert ist, zeigen aktuelle Ergebnisse, dass VEGF ebenfalls für die vaskuläre Homöostase essentiell ist. So benötigen Blutgefäße von Darm, Pankreas, Schilddrüse und Leber VEGF für ihre Aufrechterhaltung. Ohne endogenes VEGF sterben die endothelialen Zellen, so dass sich die Komplexität des Kapillarnetzwerks verringert (Kamba *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Darüber hinaus spielt VEGF eine große Rolle in der Krebsentstehung, welche durch unkontrollierte zelluläre Proliferation charakterisiert ist. Tumorwachstum und Metastasierung sind angiogeneseabhängige Prozesse, da hierbei die ausreichende Versorgung mit Blut und Nährstoffen von Bedeutung ist. Zu den Krebserkrankungen, die durch eine erhöhte VEGF Expression gekennzeichnet sind, gehören unter anderem Melanome, Darm-, Magen-, Brust-, Lungen- sowie Nierenkrebs (Berger *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 2000).

## 1.4 $\beta$ -Catenin und seine Rolle als Zytoskelettprotein

Beta-Catenin spielt nicht nur in der Aktivierung der Wnt Zielgene eine wichtige Rolle, sondern kontrolliert darüber hinaus die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion an der Plasmamembran, indem es Proteine der Adhärenzverbindungen mit dem Aktinzytoskelett verknüpft (Brembeck *et al.*, 2006). Cadherine (*Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion molecules*) sind  $Ca^{2+}$  abhängige Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten vorkommen (Cox & Hardin, 2004; Nollet *et al.*, 2000). In Anwesenheit von Kalzium-Ionen bilden Zellen mit dem gleichen E-Cadherin Typ stabile Kontakte zueinander aus, die

Adhärenzverbindungen (Pokutta & Weis, 2007). In diesen Adhärenzverbindungen interagiert die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin, während dieses wiederum an  $\alpha$ -Catenin bindet. Alpha-Catenin ist ein 906-Aminosäuren langes Protein, das Aktin bindet. Es ist zu dem Aktin-bindenden Protein Vinculin homolog, welches in Fokaladhäsionsverbindungen zu finden ist (Kobielak & Fuchs, 2004). In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin ist die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin unstrukturiert (Huber *et al.*, 2001). Neu synthetisiertes E-Cadherin assoziiert noch im Endoplasmatischen Retikulum mit  $\beta$ -Catenin, so dass die beiden Proteine gemeinsam zur Zelloberfläche transportiert werden (Hinck *et al.*, 1994). Die Auflösung dieser Interaktion führt zum proteasomalen Abbau von E-Cadherin (Chen *et al.*, 1999b). Die Sequenz von E-Cadherin weist ein PEST (Pro, Glu, Ser/Thr)-Motiv auf, das von Ubiquitin Ligasen erkannt wird. Dieses PEST-Motiv liegt in der  $\beta$ -Catenin Binderegion von E-Cadherin, so dass es im Komplex nicht zugänglich ist (Huber & Weis, 2001; Huber *et al.*, 2001). Die Interaktion zwischen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin ist sehr stabil und wird durch Phosphorylierung reguliert (Lickert *et al.*, 2000). So erhöht die Phosphorylierung von E-Cadherin durch CK2 oder GSK-3 $\beta$  die Affinität zu  $\beta$ -Catenin beinahe um das tausendfache (Choi *et al.*, 2006). Dagegen führt die Phosphorylierung von Tyr 654 des  $\beta$ -Catenins durch *c-Src* (zelluläres Homolog des Onkogens *v-src* des Rous Sarkoma Virus) zum Verlust der E-Cadherin Bindung (Roura *et al.*, 1999). Ein weiterer wichtiger Tyrosinrest des  $\beta$ -Catenins ist Tyr 142, welches durch die Tyrosinkinase Met (*Mesenchymal epithelial transition factor*) phosphoryliert werden kann (Abbildung 1.9). Dies hat den Verlust der  $\alpha$ -Catenin Bindung zur Folge, verstärkt aber auf der anderen Seite die Interaktion mit dem nukleären Transkriptions-Koaktivator Bcl9-2 (Brembeck *et al.*, 2004).



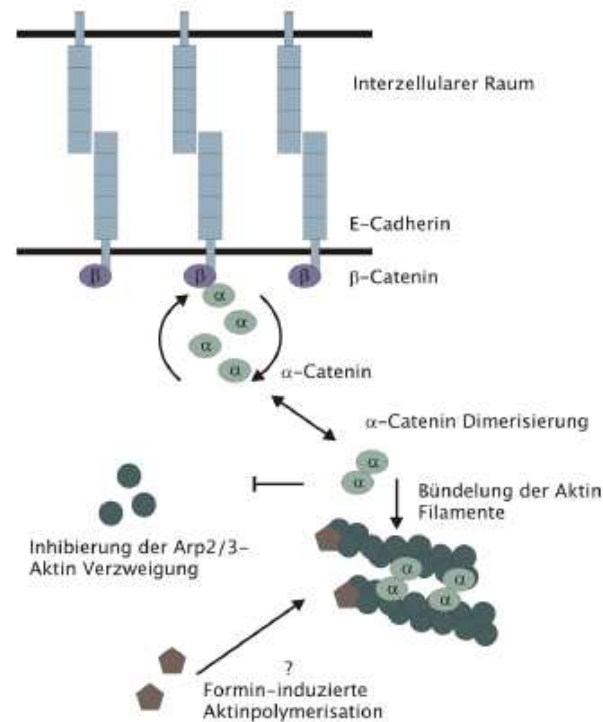
**Abb. 1.9:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von humanem  $\beta$ -Catenin. Die Ziffern eins bis zwölf bezeichnen die Armadillo-*Repeats* und die Kreise geben die im Text genannten Phosphorylierungsstellen an. Arm: Armadillo-*Repeat*.

Aufgrund der Interaktionen von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin beziehungsweise  $\beta$ -Catenin mit  $\alpha$ -Catenin wurde lange Zeit angenommen, dass  $\alpha$ -Catenin eine stabile Verbindung zwischen E-Cadherin- $\beta$ -Catenin auf der einen Seite und dem Aktinzytoskelett auf der anderen Seite

herstellt (Cowin *et al.*, 1986; Ozawa *et al.*, 1989; McCrea *et al.*, 1991; Kemler, 1993; Takeichi, 1995). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass es sich bei dem E-Cadherin- $\beta$ -Catenin- $\alpha$ -Catenin Komplex eher um einen dynamischen als um einen stabilen Komplex handelt, da  $\alpha$ -Catenin nicht gleichzeitig an  $\beta$ -Catenin und Aktin binden kann (Yamada *et al.*, 2005; Drees *et al.*, 2005; Pokutta & Weis, 2007). An der Interaktion mit  $\beta$ -Catenin beziehungsweise Aktin sind verschiedene Konformationszustände des  $\alpha$ -Catenins beteiligt. In der monomeren Form interagiert  $\alpha$ -Catenin bevorzugt mit  $\beta$ -Catenin, während  $\alpha$ -Catenin als Homodimer an Aktin bindet (Drees *et al.*, 2005). Die Bildung von Cadherin-basierten Adhäsionsverbindungen zwischen Zellen beginnt mit der vorübergehenden Interaktion der Cadherine gegenüberliegender Lamellipodien. Lamellipodien sind dynamische Strukturen, die durch Arp2/3 (*actin related proteins 2/3*) stimulierte Polymerisation von verzweigten Aktinfilamenten gebildet werden und die Membran nach außen drängen (Pollard & Boisy, 2003). Bei Ausreifung der Kontakte werden die Lamellipodien durch eine gleichmäßigere, stabile Membran ersetzt. Diese Umbildung wird durch Veränderungen des Aktinzytoskeletts begleitet (Adams & Nelson, 1998; Ehrlich *et al.*, 2002; Vaezi *et al.*, 2002), welches in linearen Bündeln organisiert wird (Hirokawa *et al.*, 1983). Alpha-Catenin inhibiert die Aktivität von Arp2/3, indem es mit diesem um Aktinfilamente konkurriert (Drees *et al.*, 2005). Abbildung 1.10 zeigt ein Modell der  $\alpha$ -Catenin Funktion in der Aktinpolymerisation und seinen Eigenschaften in der Ausbildung von Zell-Zellkontakten.

Erste Kontakte zwischen Cadherinen gegenüberliegender Lamellipodien führen zur Anhäufung von weiterem Cadherin. Da E-Cadherin vorwiegend  $\beta$ -Catenin-gebunden vorkommt, führt diese Anhäufung zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin Konzentration an den Kontaktstellen. An  $\beta$ -Catenin gebundenes  $\alpha$ -Catenin wird leicht durch zytosolisches  $\alpha$ -Catenin ausgetauscht (Drees *et al.*, 2005). Diese Bindung von  $\alpha$ -Catenin Monomeren an E-Cadherin- $\beta$ -Catenin Komplexen und anschließender Dissoziation hat eine hohe lokale  $\alpha$ -Catenin Konzentration zur Folge, so dass  $\alpha$ -Catenin dimerisieren kann. Die entstehende Population an dimerisiertem  $\alpha$ -Catenin in der Nähe der Membran ist groß genug, um die Aktivität von Arp2/3 zu inhibieren und so die Ausbildung von Lamellipodien zugunsten von stabileren Kontakten zu hemmen. Alpha-Catenin hat zum einen selbst die Fähigkeit Aktin zu bündeln (Rimm *et al.*, 1995). Zum anderen wird Formin-1, das die Bildung von linearen Aktinfilamenten fördert, durch  $\alpha$ -Catenin positiv reguliert (Kobiela *et al.*, 2004).



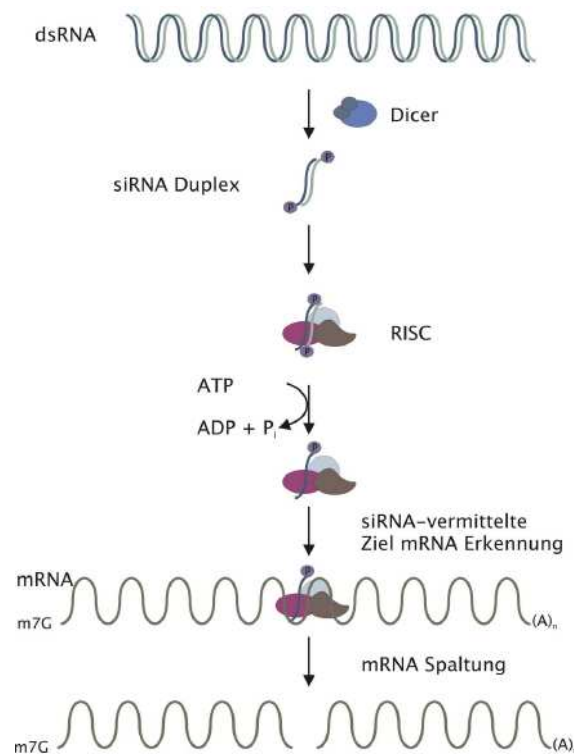


**Abb. 1.10: Modell der  $\alpha$ -Catenin Funktion in der Aktinpolymerisation** (modifiziert nach Pokutta & Weis, 2007). Erste Kontakte zwischen Cadherinen entgegengesetzter Lamellipodien führen zur Anhäufung von Cadherin. An E-Cadherin- $\beta$ -Catenin Komplexe gebundenes  $\alpha$ -Catenin wechselt schnell zwischen  $\beta$ -Catenin und dem Zytosol, so dass eine hohe lokale Konzentration an freiem  $\alpha$ -Catenin entsteht. Freies  $\alpha$ -Catenin kann dimerisieren und die Aktivität von Arp2/3 inhibieren.

Adhärenzverbindungen spielen auch in der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle. So kommt es während der Krebsentstehung zu einer Veränderung der Zellen, der so genannten epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Diese ist durch einen Verlust der Zell-Zellverbindungen und einer erhöhten Beweglichkeit der Zellen charakterisiert (Hay, 1995; Thiery, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003). Ein Kennzeichen der EMT ist der Funktionsverlust von E-Cadherin und damit die Dissoziation des E-Cadherin- $\beta$ -Catenin- $\alpha$ -Catenin Komplexes von der Membran (Brabletz *et al.*, 2001; Behrens *et al.*, 1989; Vleminckx *et al.*, 1991; Behrens *et al.*, 1993; Perl *et al.*, 1998). Die Dissoziation der Adhärenzverbindungen kann ebenfalls durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in Komponenten des Komplexes ausgelöst werden (Behrens *et al.*, 1993; Roura *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2002; Piedra *et al.*, 2003; Lilien & Balsamo, 2005). Der Verlust der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion führt zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin abhängigen Transkription (Orsulic *et al.*, 1999; Stockinger *et al.*, 2001; Gottardi *et al.*, 2001) und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Thiery, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003; Lilien & Balsamo, 2005).

## 1.5 RNA Interferenz

1998 wurde entdeckt, dass die Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *Caenorhabditis elegans* zu einer sequenzspezifischen Inaktivierung von Genen führt (Fire *et al.*). Dieser als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnete Effekt wurde bald darauf durch Verwendung von siRNA (*small interfering RNA*) ebenfalls in Säugerzellen nachgewiesen (Elbashir *et al.*, 2001a). Bei siRNA handelt es sich um kurze, doppelsträngige RNA, die durch eine Länge von 21 bis 23 Nukleotiden sowie durch zwei bis drei Nukleotid lange 3'-Überhänge gekennzeichnet ist (Elbashir *et al.*, 2001b). Die dem RNAi Prozess zugrunde liegenden molekularen Reaktionen finden im Zytoplasma statt und sind in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt (Hutvagner & Zamore, 2002; Zeng & Cullen, 2002; Kawasaki & Taira, 2003). Im ersten Schritt wird lange, doppelsträngige RNA durch das RNaseIII Enzym Dicer in kurze siRNA gespalten, welche dann in einen Multiproteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) inkorporiert wird (Bernstein *et al.*, 2001). Für den Einbau in diesen Komplex muss die siRNA an ihrem 5'-Ende phosphoryliert sein (Nykanen *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2002). Die Aktivierung von RISC beinhaltet die Spaltung des Sinnstranges. Diese wird durch die Endonuklease Argonaut2 (Ago2), welche Teil des Multiproteinkomplexes ist, vermittelt (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005). Der verbleibende einzelsträngige Gegensinnstrang führt RISC zur komplementären Sequenz der Ziel mRNA. Die Spaltung der Ziel mRNA erfolgt im Zentrum der Duplexregion von Gegensinnstrang siRNA und Ziel mRNA, zehn Nukleotide entfernt vom 5'-Ende der siRNA (Elbashir *et al.*, 2001b). Dies führt zur anschließenden Degradation der gespaltenen mRNA durch zelluläre Exonukleasen (Orban & Izaurralde, 2005). Ist RISC einmal durch den Gegensinnstrang aktiviert, können mehrere Spaltungsrunden komplementärer mRNA erfolgen, so dass eine ausgeprägte Geninaktivierung erreicht werden kann (Hutvagner & Zamore, 2002). Ein effektiver RNAi Mechanismus benötigt perfekte beziehungsweise nahezu perfekte Watson-Crick Basenpaarung zwischen dem mRNA Transkript und der entsprechenden siRNA (Kim & Rossi, 2007).



**Abb. 1.11: Der RNA Interferenz Signalweg** (modifiziert nach Dykxhoorn *et al.*, 2003). Lange dsRNA wird durch Dicer in siRNA gespalten und in den Multienzymkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) eingebaut. Der Sinnstrang der siRNA wird abgebaut und der Gegenseinstrang leitet RISC zur komplementären mRNA Sequenz, die daraufhin gespalten und abgebaut wird.

Der RNAi Prozess fungiert in Nematoden, Insekten und Pflanzen als immanenter antiviraler Verteidigungsmechanismus, bei dem virale dsRNA durch Dicer in siRNA gespalten und so in der RNAi Antwort eingesetzt wird. Ob diese posttranskriptionale Geninaktivierung in der intrinsischen Immunität von Säugerzellen gegen virale Infektionen ebenfalls existiert, ist bislang unklar. Eine Limitierung der RNAi Technik in Säugerzellen ist, dass dsRNA, die länger als 30 Nukleotide ist, eine unspezifische Interferon Antwort auslöst (Elbashir *et al.*, 2001a). Interferon aktiviert unter anderem die Proteinkinase DAI (*double-stranded RNA-activated inhibitor*) und führt so zu einer globalen Inhibierung der mRNA Translation (Manche *et al.*, 1992). Andere Nebenwirkungen werden durch TLRs (*Toll-like receptors*) ausgelöst, die in Endosomen exprimiert werden, indem sie zur Translokation von NF- $\kappa$ B, IRF (*interferon regulatory factor*) und ATF2 (*activating transcription factor 2*) in den Zellkern führen (Seth *et al.*, 2006). TLR3, welcher dsRNA erkennt, und TLR7 sowie TLR8, die beide ssRNA erkennen, fungieren als Motiv-Erkennungssensoren der spezifischen immunstimulierenden Sequenzmotive 5'-GUCCUCAA-3' und 5'-UGUGU-3' (Hornung *et al.*, 2005; Judge *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist chemisch synthetisierte siRNA anderer siRNA, die mit Hilfe der T7 RNA Polymerase hergestellt wurde, vorzuziehen, da letztere 5'-

Triphosphate beinhaltet, welche eine Interferon Antwort auslösen (Kim *et al.*, 2004b). Schließlich wirkt siRNA mit stumpfen Enden, der die charakteristischen zwei Nukleotide langen 3'-Überhänge fehlen, ebenfalls immunstimulatorisch. Sie wird durch die Helikase RIG-1 (*retinoic acid gene 1*) erkannt (Marques *et al.*, 2006).

Der große Nutzen der siRNA Technik in der Erforschung der Funktion verschiedener Gene ist hinlänglich bekannt. Darüber hinaus wird der Einsatz von siRNA in der Therapie diskutiert und bereits in ersten klinischen Studien bei Krankheiten wie AMD (*age-related macular degeneration*) (Check, 2005; McFarland *et al.*, 2004) oder RSV (*respiratory syncytial virus*) Infektionen (Bitko *et al.*, 2005) eingesetzt.

## 2. Zielsetzung

Bislang ist die exakte Rolle des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene in der karzinogenen Kaskade nicht genau bekannt. Die ausgewählten Zielgene *c-Myc* (He *et al.*, 1998), *CCND1* (kodiert Cyclin D1) (Tetsu & McCormick, 1999; Shtutman *et al.*, 1999) und *VEGF* (Zhang *et al.*, 2001) sind in verschiedenen Stadien der Krebsentwicklung entscheidend. Um die genaue Funktion des Wnt Signalwegs zu verstehen, ist es wichtig die einzelnen Zielgene und ihre zellulären Effekte unabhängig voneinander zu untersuchen. So soll in dieser Arbeit ermittelt werden, ob alle ausgewählten Zielgene eine ähnliche Funktion haben, zum Beispiel in der Aktivierung der Proliferation, oder ob die Inaktivierung eines einzelnen Gens einen globalen Effekt verursachen kann. Hierfür sollen die betreffenden Gene mittels RNA Interferenz inaktiviert und die entstehenden zellulären Effekte in verschiedenen Krebszelllinien untersucht werden. Als Modellsysteme werden die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480 sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa verwendet. Als analytische Parameter sollen Proliferation, Apoptose und Migration sowie der Stoffwechsel und die Morphologie der Zellen untersucht werden.

Die Ergebnisse werden helfen die Funktionen der unterschiedlichen Zielgene und ihrer Expressionsprodukte sowie die Rolle des aktiven Wnt Signalwegs innerhalb des karzinogenen Prozesses zu verstehen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage Sartorius Basic 3100 P	Sartorius AG (Göttingen)
Biosprint DS Videodokumentationssystem	LFT (Wasserburg/B)
Blottingzelle Fastblot B43	Biometra (Göttingen)
Brutschrank Nuaire DHD Autoflow	Nuaire (Vertrieb über Integra Biosciences, Fernwald)
Brutschrank WTB Binder	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Elektrophoresekammern für Agarosegele (Mini, Midi, Large)	Roth (Karlsruhe)
ELISA-Photometer MR 5000	Dynatech (Denkendorf)
FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACS LSRII	Becton Dickinson (Heidelberg)
Feinwaage Mettler PM 480 Delta Range	Mettler-Tolodo-GmbH (Giessen)
Gas-Sicherheitsbrenner Gasprofi SCSi	Roth (Karlsruhe)
Gelscanner Bioprofil 5.0	Fröbel (Lindau)
GeneAmp® 5800 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Horizontalschüttler	Stuart Scientific
Kryo-Container	Nalgene (Rochester, USA)
Mehrkanalpipetten	Titertek 30 µl (Eflab), 100 µl, 300 µl (Eppendorf, Hamburg)
Mikroskop Axiophot	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Nikon eclipse TS 100	Nikon (Tokyo, Japan)
Mikroskop Leitz Labovert	Leica (Wetzlar)
Netzgeräte	Biometra (Göttingen), BioRad (München)
Neubauer Zählkammer	GE Healthcare (München) Brand (Wertheim)

PCR Cycler TRIO Thermoblock	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	Orion (Vertrieb über ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg), Gilson (Abimed, Langenfeld) ThermoFisher Scientific (Schwerte)
Pipettierhilfe Pipetboy Accu	Integra Biosciences (Fernwald)
Plattenleser Infinite M2000	Tecan (Crailsheim)
Plattenschüttler Certomat® MT	Oehmen Labortechnik (Essen)
Sequenzierer M3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems Applera (Darmstadt)
Spektralphotometer BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Sterilbank Nuaire Biological Safety Cabinet	Nuaire (Vertrieb über Integra Biosciences, Fernwald)
Thermoblock Techne Dri-Block®DB2A	Techne (Jahnsdorf)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau)
Tischzentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments (Hanau)
Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Ultraschallgerät Sonifier W450	Branson
UV-Transilluminator	lth Labortechnik (Wasserburg/B.)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellzähler	Mölab (Langenfeld)
Zentrifuge TechnoSPIN®	Sorvall® Instruments (DuPont, Bad Homburg v.d.H.)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- und 96-Loch Platten	BD Falcon (Heidelberg)
96-Loch-Reaktionsplatten, weiß	Corning (Corning NY, USA)
96-Loch-Reaktionsplatten, schwarz	BD Falcon (Heidelberg)
Deckgläschen 21 mm	Roth (Karlsruhe)
Einmalspritzen (20 ml)	Braun (Melsungen)
Filterspitzen diamond precision tips	Gilson (Abimed, Langenfeld)
Gewebekulturschalen	BD Falcon (Heidelberg)
Gewebekulturschalen mit Gitter	Nunc (Wiesbaden)
Halbmikroküvetten UVette	Eppendorf (Hamburg)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (München)
Kryogefäße	Nalgene (Rochester, USA)
Objektträger (Super Frost Color)	Menzel (Braunschweig)
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard für Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen precision tips	Gilson (Abimed, Langenfeld)
Plastik-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
PVDF Membran Hypond P	GE Healthcare (München)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
SlimFast Schokolade (Trockenmilchhaltiges Getränkepulver)	Allpharm (Messel)
Sterilfilter	Whatman (Vertrieb über Schleicher & Schüll, Dassel)
ThermoFast 96 Abi Detection Plate	ABgene (Vertrieb über ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Ultraclear Optical Cap Strips	ABgene (Vertrieb über ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Whatman Papier (3 mm)	Whatman (Vertrieb über Schleicher & Schüller, Dassel)
Zellkulturflaschen	BD Falcon (Heidelberg)
Zellschaber, steril	BD Falcon (Heidelberg)



### 3.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien und Reagenzien von den folgenden Firmen bezogen:

Fluka (Buchs, Schweiz)  
GE Healthcare (München)  
Gerbu Biotechnik (Galberg)  
Gibco BRL (Paisley, UK)  
Invitrogen (Karlsruhe)  
Merck (Darmstadt)  
Riedel-de-Hän (Seelze)  
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)  
Roth (Karlsruhe)  
Serva Feinbiochemica (Heidelberg)  
Sigma Aldrich (München)

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

5x SDS Probenpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau 20% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
6x DNA Auftragspuffer	30% (v/v) Glyzerin 0,4% (w/v) Orange G 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM EDTA
10x TBS	0,2 M Tris 1,37 M NaCl pH 7,6 eingestellt mit HCl

---

10x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
50x TAE Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA pH 8,0 eingestellt mit Essigsäure
Agaroselösung für DNA Gelelektrophorese	1% (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer
dNTP Lösung	10 mM von jedem Deoxyribonukleotid
Entwicklerlösung	Neutol Liquid NE (Agfa) 1:7 verdünnt mit H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidlösung (1%)	Roth (Karlsruhe)
Fixierer	FX-Universal (Agfa) 1:5 verdünnt mit H <sub>2</sub> O
Färbelösung ohne X-Gal	5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 2 mM MgCl <sub>2</sub> aufgefüllt mit 1x PBS
Färbelösung mit X-Gal	5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mg/ml X-Gal aufgefüllt mit 1x PBS

Lysepuffer für Zellzyklusanalyse	15 mM Tris 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 mM Spermintetrahydrochlorid 80 mM KCl 20 mM NaCl 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5 15 mM β-Mercaptoethanol, bei 4°C lagern
PBS	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 80 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 mM NaCl pH 7,5 für Zellkultur autoklaviert
PBS/T	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween
Ponceau S Lösung	Sigma Aldrich (München)
Sammelgelpuffer für SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	0,5 M Tris-HCl 14 mM SDS pH 6,8
Stripping Puffer	7 M Guanidin Hydrochlorid 50 mM Glyzerin 0,05 mM EDTA 0,1 mM KCl 20 mM β-Mercaptoethanol pH 10,8 (vor EDTA Zugabe)
TBS/T	1x TBS mit 0,1% (v/v) Tween

Transferpuffer	90 mM Tris 0,2 M Glycin 10% (v/v) MeOH
Trenngelbuffer für SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	1,07 M Tris-HCl 14 mM SDS pH 8,8
Zellysepuffer	25 mM Tris 2 mM EDTA 10% (v/v) Glyzerin 1% (v/v) Triton X-100 1 mM DTE pH 7,8 eingestellt mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (vor DTE Zugabe)

### 3.1.5 Reagenziensets („Kits“)

ABI PRISM™ BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer (Überlingen)
Apo-ONE-Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega (Mannheim)
BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare (München)
Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden)
QCM™ chemotaxis 96-well cell migration assay	Millipore (Schwalbach)
QIAshredder™	Qiagen (Hilden)
Quantikine® Human VEGF	R&D Systems (Wiesbaden- Nordenstadt)

QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)

### 3.1.6 Nukleinsäure- und Proteinstandards

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus                      Fermentas (St. Leon-Rot)  
(DNA Abschnitte mit 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp)

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus                      Fermentas (St. Leon-Rot)  
(DNA Abschnitte mit 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75 bp)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus                      Fermentas (St. Leon-Rot)  
(Proteine zu 230, 130, 95, 72, 56, 36, 28, 17, 11 kDa)

### 3.1.7 RNA Interferenz (siRNA)

Die verwendete siRNA wurde von Dharmacon (Vertrieb über Perbio, Bonn) bezogen und ist in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 3.1).

**Tab. 3.1: Liste der eingesetzten siRNA und deren Sequenzen.** P: Phosphat.

Bezeichnung	Sequenz(en) Sinnstrang 5'→3'	Sequenz(en) Gegenstrang 3'→5'
Cyclin D1 siRNA (siGENOME SMARTpool )	1. ugaacaagcucaaguggaau 2. ccagagugaucaagugugauu 3. guucguggccucuaagauguu 4. ccgagaagcugugcaucuaau	1. P.uuccacuugagcuuguucauu 2. P.ucacacuugaucacucugguu 3. P.caucuuagaggccacgaacuu 4. P.uagaugcacagcuucucgguu
c-Myc siRNA (siGENOME SMARTpool )	1. aacguuagcuuacccaacauu 2. ggaacuaugaccucgacuauu 3. gaacacacaagcucuggaau 4. ggacuauccugcugccaaguu	1. P.uguuggugaagcuaacguuuu 2. P.uagucgaggucuaaguuccuu 3. P.uccaagacguuguguguucuu 4. P.cuuggcagcaggauaguccuu
VEGF siRNA (siGENOME SMARTpool )	1. gcagaaucaucacgaaguguu 2. gaucaaacaccaccaagguu 3. ggaguaccugaugagauuu 4. agaaagauagagcaagacauu	1. P. cacuucgugaugauucugcuu 2. P. gccuuggugagguuuagauuu 3. P.gaucucaucaggguaucuccuu 4. P.ugucuugcucuaucuuucuuu
β-Catenin siRNA (siGENOME SMARTpool )	1. gcugaaacaugcaguuguauu 2. gauaaaagguacuguuggauu 3. ccacuaauguccagcguuuuu 4. acaaguagcugauuuugauuu	1. P.uacaacugcauguuucagcuu 2. P.uccaacaguagccuuuauuu 3. P.aaacgucggacauuagugguu 4. P.aucaauaucagcuacuuguuu
non-targeting siRNA (siCONTROL non- targeting siRNA #1)	1. uagcgacuaaacacauca	
GAPDH siRNA (siCONTROL GAPD siRNA)	1. ugguuuacauguuccaauuu	1. P.uauuggaacauguuaacauu
siGLO Red Transfection Indicator		

### 3.1.8 Primer für die quantitative real-time RT PCR

Die Sequenzen der verwendeten Primer zur quantitativen real-time RT PCR sind im Folgenden aufgeführt (5'→3'). Der jeweilige forward Primer wurde ebenfalls zur Sequenzierung der Produkte genutzt.

β-Aktin forward	gtcttcccctccatcgtggg
β-Aktin reverse	gtgaggatgcctctcttctctg
β-Catenin forward	gatcttggacttgatattggtgccag
β-Catenin reverse	tccataccaaggcatcctggcc
c-Myc forward	ccgagcaaggacgcgactctc
c-Myc reverse	gcctttcagagaagcgggtct

Cyclin D1 forward	gcctgaacctgaggagcccca
Cyclin D1 reverse	gtcacacttgatcactctgg
Hexokinase-2 forward	atgttgttactgattctcctgtcagag
Hexokinase-2 reverse	cttgattccaggaatggcaaagtctg
NADH Dehydrogenase Ubiquinon Flavoprotein 1 forward	cagtgcctatgaaggtgacagcgtga
NADH Dehydrogenase Ubiquinon Flavoprotein 1 reverse	atgaggtttcttgggtgctgtcgt
p21 forward	aagcctgcagtcctggaagcgc
p21 reverse	ccagggtatgtacatgaggaggtgt
p53 forward	atagtgtggtggtgccctatgag
p53 reverse	tgatggtgaggatgggcctcc
Pyruvat Dehydrogenase $\beta$ forward	aagagatgagaaggtatttctgcttg
Pyruvat Dehydrogenase $\beta$ reverse	gcccatctctgatatgggagtgct
ROCK2 forward	ggatgaaacaggcatggtacattgtga
ROCK2 reverse	gcatctcataaaggaaaacacctacag
Thrombospondin-1 forward	aagcactaaggggagggcgcata
Thrombospondin-1 reverse	cagtctttgtctcccttctgcttct
Transferrin Rezeptor forward	agaggtcgtggtcagttcgtgatt
Transferrin Rezeptor reverse	gctctgtattggttcagatccctcac
VEGF forward	catgacagcggcccttctg
VEGF reverse	tgtgaggacataggtccttttagctg

### 3.1.9 Antikörper

#### 3.1.9.1 Primäre Antikörper

Die verwendeten primären Antikörper für den Nachweis von Proteinen im Western Blot und in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

**Tab. 3.2: Ungekoppelte Erstantikörper für den Nachweis von Proteinen.**

Antikörper	Isotyp		Bildungsorganismus	Hersteller
anti- $\beta$ -Aktin (ab6276)	IgG1	monoklonal	Maus	Abcam (Cambridge, UK)
anti- $\beta$ -Catenin (610154)	IgG1	monoklonal	Maus	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-c-Myc (AF3696)	IgG	polyklonal	Ziege	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
anti-Cyclin D1 (sc-718)	IgG	pölyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-E-Cadherin (T-1338)	IgG1	monoklonal	Maus	Dianova (Hamburg)
anti-GAPDH (ab8245)	IgG1	monoklonal	Maus	Abcam (Cambridge, UK)
anti-Ki-67 (M 7240)	IgG1	monoklonal	Maus	Dako Cytomation
anti-Tubulin (T 4026)	IgG	monoklonal	Maus	Sigma Aldrich (München)
anti-Vinculin (V 9131)	IgG1	monoklonal	Maus	Sigma Aldrich (München)

### 3.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

**Tab. 3.3: Gekoppelte Zweitantikörper.** Alle verwendeten Antikörper sind vom Isotyp IgG. HRPO: Horseradish peroxidase, Cy3: Indocarbocyanin.

Antigen	Bildungsorganismus	Kopplung	Hersteller
Kaninchen	Esel	HRPO	GE Healthcare (München)
Maus	Esel	HRPO	GE Healthcare (München)
Maus	Ziege	Cy3	Dianova (Hamburg)
Ziege	Kaninchen	HRPO	Sigma Aldrich (München)



### 3.1.10 Nährmedien, Zusätze und Antibiotika für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA (Cölbe)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL (Paisley, UK)
L-Glutamin (200 mM)	PAA (Cölbe)
Natriumpyruvat (100 nM)	PAA (Cölbe)
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA (Cölbe)
Penicillin (50 U/ml)/	PAA (Cölbe)
Streptomycin (50 µg/ml) Lösung	
Trypsin-EDTA Lösung	PAA (Cölbe)

### 3.1.11 Transfektionsreagenz für die Zellkultur

DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Dharmacon (Vertrieb über Perbio, Bonn)
-----------------------------------	--

### 3.1.12 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

**Tab. 3.4: Verwendete Zelllinien und deren Bezugsquelle.**

Zelllinie	Zellart	Eigenschaften	Referenz	Bezugsquelle
HCT116	Menschliche Kolon-Adenokarzinomzelllinie, gering differenziert	β-Catenin Mutation	Brattain <i>et al.</i> , 1981	American Type Culture Collection (ATCC)
SW480	Menschliche Kolon-Adenomkarzinomzelllinie, gering differenziert	APC Mutation	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976	ATCC
HeLa	Menschliche Zervix-Adenokarzinomzelllinie, gering differenziert	HPV-18 Infektion	Scherer <i>et al.</i> , 1953	ATCC

### 3.1.13 Software

Neben den üblichen Programmen zur Text- und Bildverarbeitung wurde die folgende Software genutzt:

GeneAmp® 5700 SDS Software

Applied Biosystems Applera  
(Darmstadt)

Advanced Image Data Analyzer (AIDA)

Raytest Isotopenmessgeräte  
(Straubenhardt)

Axiovision Release 4.6.3

Zeiss (Oberkochen)

BD FACS DiVa™

Becton Dickinson (Heidelberg)

CellQuest™ Pro

Becton Dickinson (Heidelberg)

Flow Jo

TreeStar Inc. (Ashland, USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Dazu wurden die in 6-Loch Platten kultivierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit  $\beta$ -Mercaptoethanol- und Guanidiniumisothiocyanathaltigem RLT-Lysepuffer zur sofortigen Denaturierung von RNasen lysiert. Das Lysat wurde auf eine „QIAshredder“-Säule (Qiagen) gegeben und durch Zentrifugation homogenisiert. Nach Zugabe von 70%igem Ethanol wurde der Durchfluss auf eine Säule mit Silicagel-Membran gegeben, an die die RNA bindet. Anschließend wurden die gebundenen Nukleinsäuren mit RNase-freier DNase (Qiagen) nach Angaben des Herstellers behandelt, um eventuell enthaltene genomische DNA zu beseitigen. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption der RNA Lösung bei 260 nm ermittelt. Bei dieser Wellenlänge haben die aromatischen Ringe der Basen ihr Absorptionsmaximum. Eine Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde in eine Halbmikroküvette (UVette, Eppendorf) gegeben und die relative Absorption bei 260 nm wurde gegen eine entsprechende Referenzlösung in einem Spektralphotometer bestimmt. Dabei liegen die Absorptionswerte zwischen 0,05 und 1 im linearen Bereich, wobei ein Wert von 1 einer Konzentration von 40  $\mu$ g/ml einzelsträngiger RNA entspricht. Durch Berechnung des Quotienten aus  $OD_{260}/OD_{280}$  lässt sich die Proteinkontamination in der Lösung bestimmen, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Der Quotient wird außerdem durch den pH Wert und den Salzgehalt der Lösung beeinflusst, sodass dieser Wert nur bedingt zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung genutzt werden kann (Wilfinger *et al.*, 1997).

### 3.2.1.3 Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription wird mRNA in komplementäre cDNA (complementary DNA) umgeschrieben, die dann als Vorlage für eine quantitative real-time PCR eingesetzt werden kann (vergleiche Abschnitt 3.1.1.4). In dieser Arbeit wurde die cDNA mit Hilfe der Omniscript RT (Qiagen) von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen hergestellt. Für die Reverse Transkription wurde ein Primer genutzt, der an die Poly-A<sup>+</sup>-Enden der mRNA bindet. Somit wurden die cDNA Synthese und die anschließende PCR nacheinander in verschiedenen Gefäßen durchgeführt („Two tube Reverse Transkription-PCR“). In Tabelle 3.5 ist die Zusammensetzung eines Ansatzes zur cDNA Synthese aufgeführt.

**Tab. 3.5: Ansatz für eine cDNA Synthese**

Reagenzien	Menge
mRNA	1,5 µg
10x RT PCR Puffer	2 µl
Oligo dT Primer (10 µM)	2 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	0,5 µl
dNTPs (je 5 mM)	2 µl
Omniscript RT	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym Reverse Transkriptase durch Inkubation für fünf Minuten bei 93°C inaktiviert.

### 3.2.1.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) kann die RNA Menge eines Produktes in einer Ausgangslösung quantitativ bestimmt werden. Die qRT-PCR unterscheidet sich von einer normalen PCR dadurch, dass die Produktmenge nach jeder Amplifikationsrunde verfolgt wird (real-time Detektion). Dafür wurde in dieser Arbeit das „QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I, der in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert. Dadurch wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches gesteigert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der gebildeten Produktmenge. Da SYBR® Green I unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, wurde das Produkt jedes Primerpaares zunächst gelelektrophoretisch und durch

Sequenzierung bestimmt. Außerdem wurde die Produktreinheit in jeder qRT-PCR durch Aufnahme einer Schmelzkurve untersucht. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie mit etwa 60°C eine ähnliche Schmelztemperatur aufwiesen und zu einem Produkt von circa 100 bp Länge führten. Die quantitative real-time PCR wurde in weißen 96-Loch Reaktionsplatten mit transparentem Deckel (ABgene) durchgeführt. Die durch Reverse Transkription hergestellte cDNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 4 ng/μl verdünnt. Anschließend wurden davon 2,5 μl (10 ng) als Template eingesetzt. Je Probe und Gen wurde dabei eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem dienten zusätzliche Ansätze ohne Template (non-template control, NTC) der Kontrolle. Ein solcher Ansatz ist in Tabelle 3.6 aufgeführt.

**Tab. 3.6: Ansatz für eine quantitative real-time PCR.**

Reagenzien	Menge
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Mastermix	12,5 μl
Primerpaar (5 μM forward- und 5 μM reverse Primer)	3 μl
ddH <sub>2</sub> O	7 μl

Die qRT-PCR Reaktion wurde mit Hilfe des GeneAmp® 5700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) nach folgendem Programm (Tabelle 3.7) durchgeführt und mit der GeneAmp® 5700 SDS Software ausgewertet.

**Tab. 3.7: Programm für eine quantitative real-time PCR.**

50°C	2 min	1x
95°C	15 min	1x
94°C	15 sec	40x
56°C	30 sec	
72°C	30 sec	

Außerdem wurde bei jeder quantitativen real-time PCR zur Kontrolle der Produktbildung eine Schmelzkurve von 56°C an aufsteigend aufgenommen.

Zur Auswertung der qRT-PCR wurde zunächst der so genannte C<sub>T</sub>-Wert (Threshold Cycle) bestimmt. Bei diesem Wert handelt es sich um den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Er befindet sich zu Beginn der

exponentiellen Amplifikationsphase und ist bei linearer Darstellung des Fluoreszenzsignals gegen die Zykluszahl in der Mitte des linearen Anstiegs zu finden. Der Schwellenwert  $C_T$  wird bei einem hohen Ausgangsgehalt der Probe früh erreicht, während wenig Ausgangsmaterial mit einem hohen  $C_T$ -Wert korreliert. In dieser Arbeit wurde für jeden Datensatz ein geeigneter Schwellenwert bestimmt.

Mit Hilfe des  $C_T$ -Wertes konnte anschließend die Auswertung nach der delta-delta- $C_T$ -Methode erfolgen (Livak & Schmittgen, 2001). Hierbei wird die relative Produktmenge zwischen zwei Proben A und B verglichen, wobei A in diesem Fall eine siRNA behandelte Probe und B die non-targeting siRNA behandelte Kontrolle darstellt. Hierbei wird die unterschiedliche Ausgangsmenge als n-fache Expression von A zu B angegeben und ermöglicht so die relative Quantifizierung der qRT-PCR Daten. Als interne Kontrolle der eingesetzten RNA- beziehungsweise cDNA Menge diente in dieser Arbeit das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Im ersten Schritt der Auswertung werden die  $C_T$ -Werte des Referenzgens ( $\beta$ -Aktin) von denen des zu untersuchenden Gens abgezogen, so dass sich daraus der delta- $C_T$ -Wert ergibt:

$$C_T(\text{Gen}) - C_T(\beta\text{-Aktin}) = \text{delta-}C_T.$$

Anschließend kann der delta-delta- $C_T$ -Wert ermittelt werden, indem die delta- $C_T$ -Werte der zu vergleichenden Proben A und B voneinander abgezogen werden:

$$\text{delta } C_T(\text{Probe A}) - \text{delta } C_T(\text{Probe B}) = \text{delta-delta-}C_T.$$

Die n-fache Expression von Probe A zu Probe B ergibt sich schließlich durch folgende Formel:

$$2^{-\text{delta-delta-} C_T} = \text{n-fache Expression (Probe A zu Probe B)}.$$

Durch Multiplikation mit 100 kann dieser Faktor als prozentualer Anteil von Probe A an Probe B dargestellt werden. Als Kontrolle dienten in dieser Arbeit mit non-targeting siRNA behandelte Zellen. Der entsprechende delta-delta- $C_T$ -Wert des zu untersuchenden Gens entsprach in diesem Ansatz folglich 1 beziehungsweise 100%.

Aus den delta-delta- $C_T$ -Werten verschiedener unabhängiger Experimente wurden Mittelwerte gebildet und der Mittlere Fehler des Mittelwertes (F) mit Hilfe folgender Funktion ermittelt:

$$F = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad \begin{array}{l} \bar{x} = \text{Mittelwert} \\ n = \text{Anzahl der Messwerte} \end{array}$$

### 3.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse des Produktes jedes erstmals genutzten Primerpaares wurde zunächst eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden DNA Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Mit Hilfe eines parallel aufgetragenen DNA Größenstandards lässt sich die Basenlänge linearer DNA Fragmente ermitteln. In dieser Arbeit wurden 2%ige (w/v) Agarosegele in 1x TAE zur Größenbestimmung der Produkte der qRT-PCR genutzt. Um die DNA Fragmente zu visualisieren, wurde der Agaroselösung 0,0002% (w/v) Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA Proben wurden mit 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V mit 1x TAE als Laufpuffer. Nach dem Lauf wurden die Primerprodukte durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid bei 312 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit dem Bioprint DS Videodokumentationssystem (LTF) mit der Software BioCapt Version 11.02 dokumentiert.

### 3.2.1.6 Reinigung der DNA Fragmente durch Ethanolfällung

Vor der Sequenzierung wurden die Produkte der qRT-PCR zunächst durch Ethanolfällung gereinigt, um sie von Enzymen, nicht verbrauchten Nukleotiden, sowie von Oligonukleotiden und Salzen zu säubern. Dazu wurden 2 µl 3 M Natriumacetat, 2 µl 125 mM EDTA und 50 µl absoluter Ethanol zu 20 µl PCR Ansatz gegeben und zehn Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zehn Minuten bei 10000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Um verbliebenes Acetatsalz zu entfernen, wurde das Präzipitat mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und zehn Minuten bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die gefällte DNA an der Luft getrocknet. Sollte anschließend eine Sequenzierung erfolgen, wurde das Präzipitat in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). In dieser Arbeit wurde dazu das „ABI PRISM“ Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit“ der Firma Perkin Elmer genutzt. Dabei wird die zu sequenzierende DNA von einer thermostabilen DNA Polymerase unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotiden mittels PCR amplifiziert. Die

Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) haben basenspezifische Fluoreszenzmarkierungen und führen aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Strangabbruch. Sie sind mit normalen Desoxyribonukleotiden im Verhältnis von 1 zu 200 gemischt. Der jeweilige Startpunkt der Polymerase und somit der Sequenzierung wird durch fragmentspezifische Primer definiert, so dass in der PCR DNA Fragmente entstehen, die sich in ihrer Länge unterscheiden und mit einer fluoreszierenden Base enden. Die Basensequenz kann durch Größentrennung mittels Kapillarelektrophorese und durch Fluoreszenzmarkierung ermittelt werden. Die Ansätze für die Sequenzier-PCR wurden mit Hilfe eines Sequenzier-Kits angesetzt, das die Polymerase AmpliTaq<sup>®</sup>FS, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthielt. In Tabelle 3.8 ist ein Ansatz für eine Sequenzier-PCR dargestellt.

**Tab. 3.8: Ansatz für eine Sequenzier-PCR.**

Reagenzien	Volumen
DNA Template	1 bis 5 µl
Terminator Mix	4 µl
Primer (3,5 µM)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

Das Programm der Sequenzier-PCR ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tab. 3.9: Programm für eine Sequenzier-PCR.**

96°C	30 sec	Denaturierung	1 x
96°C	30 sec	Denaturierung	25 x
50°C	15 sec	Annealing	
60°C	4 min	Elongation	

Nach Abschluss der PCR Reaktion wurde die amplifizierte DNA erneut gefällt (vergleiche Abschnitt 3.1.1.6). Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte in der zentralen Einrichtung für „Biotechnologie“ am MPI Dortmund mit Hilfe des Sequenziergeräts der Firma Applied Biosystems (Modell: 3100 Genetic Analyser).



## 3.2.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

#### 3.2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als Zellsuspension in 10% DMSO (v/v) in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurde die Suspension in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter der sterilen Werkbank in eine Kulturflasche mit 0,2 ml Medium pro cm<sup>2</sup> überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert (siehe Abschnitt 3.2.2.1.2). Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um das zytotoxische DMSO sowie nicht angeheftete Zellen zu entfernen.

#### 3.2.2.1.2 Subkultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte in verschiedenen Kulturgefäßen im Brutschrank mit einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 7,5%, einer Temperatur von 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Dazu wurde für alle Zelllinien das Basismedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) genutzt, welches mit den folgenden Zusätzen versehen war: 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), Penicillin (2,85 U/ml) und Streptomycin (2,85 µg/ml), L-Glutamin (11,4 mM), nicht-essentielle Aminosäuren (0,57 mM) und Natrium-Pyruvat (11 nM). Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig mit Hilfe eines Lichtmikroskops verfolgt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zur Passage wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert wurden. Nach Ablösen vom Gefäßboden wurden die Zellen mit dem neunfachen Volumen Medium resuspendiert, wobei aneinander haftende Zellen durch triturieren vereinzelt wurden. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde in ein neues Kulturgefäß überführt, welches frisches Medium enthielt. Die Verdünnung richtete sich dabei nach der Teilungsrate der jeweiligen Zelllinie.

### 3.2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Nach dem Ablösen wurde die Anzahl an Zellen in der Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde ein Tropfen der Zellsuspension unter das Deckgläschen der Zählkammer gegeben und die Zellen in den vier Großquadraten bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt. Durch Bildung des Mittelwerts und Multiplikation mit dem Kammerfaktor  $10^4$  [Zellen/ml] wurde die Zellzahl je ml Suspension ermittelt. Alternativ wurde ein automatischer Zellzähler (Mölab) zur Zellzahlbestimmung verwendet.

### 3.2.2.1.4 Kryokonservierung

Zur Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dabei wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in maximal 1,5 ml Medium mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in einem Kryo-Container (Nalgene), welcher mit 100%igem 2-Propanol befüllt war, über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  inkubiert, bevor sie in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt wurden. Dies ermöglichte eine langsame Abkühlung der Zellen um  $1^\circ\text{C}$  pro Minute.

## 3.2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA

### 3.2.2.2.1 Transiente Transfektion von Zellen

In dieser Arbeit wurde die Transfektion der verschiedenen Zelllinien mit DharmaFECT 1 (Dharmacon) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei DharmaFECT 1 handelt es sich um ein liposomales Transfektionsreagenz, das neben neutralen Kolipiden vor allem kationische Lipide enthält. Diese bilden mit der negativ geladenen siRNA einen Liposomen-siRNA Komplex, von dem angenommen wird, dass er mit der Membran der Zelle verschmelzen kann und von der Zelle durch Endozytose aufgenommen wird. Vor den Versuchen wurde für jede Zelllinie und jedes Format die beste Transfektionsbedingung ermittelt. Dies erfolgte entweder durch Transfektion von GAPDH siRNA (siehe Abschnitt 3.2.2.2.2) oder von fluoreszenzmarkierter siRNA (siehe Abschnitt 3.2.2.2.3).

### **3.2.2.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels GAPDH siRNA**

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit GAPDH siRNA transfiziert. Dazu wurden verschiedene Mengen des Transfektionsreagenzes DharmaFECT 1 gewählt, wobei die Menge an siRNA mit 100 nM konstant blieb, so dass die Liposomen-siRNA Komplexe in verschiedenen Verhältnissen vorlagen. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Außerdem wurden sowohl Medien ohne FCS als auch mit 10% FCS sowie verschiedene Zellzahlen getestet, da eine effiziente Transfektion vor allem während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion wurden Zelllysate hergestellt (siehe Abschnitt 3.2.2.3), die mittels Western Blot (siehe Abschnitt 3.2.4) auf ihren GAPDH Proteingehalt getestet wurden. Die Normalisierung der Gesamtproteinmenge erfolgte durch das Haushaltsprotein  $\beta$ -Aktin. Die Transfektionsbedingung, die im Vergleich zu den Kontrollzelllysaten die effizienteste Senkung des GAPDH Proteingehalts zeigte, wurde für weitere Versuche genutzt.

### **3.2.2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels fluoreszenzmarkierter siRNA**

Alternativ wurden die Transfektionsbedingungen der verschiedenen Zelllinien mit Hilfe von fluoreszenzmarkierter siRNA optimiert. Dazu wurden wie in Abschnitt 3.2.2.2.2 beschrieben verschiedene Mengen Transfektionsreagenz, unterschiedliche Medien und Zellzahlen getestet. Die Analyse der Transfektionseffizienz erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Zu diesem Zeitpunkt wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen mit Formaldehyd fixiert (siehe Abschnitt 3.2.3.1) und wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben mit einem Deckglas eingebettet und anschließend mit Hilfe des Mikroskops Axiophot (Zeiss) untersucht. Die Transfektionsbedingung, die die höchste Anzahl an fluoreszenzmarkierten Zellen zeigte, wurde für weitere Versuche genutzt.

Die optimierten Transfektionsbedingungen für die verschiedenen Zelllinien und Formate sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

**Tab. 3.10: Bedingungen für die Transfektion von siRNA.**

Zelllinie	Format	Zellzahl	DharmaFECT: Gesamtansatz
HCT116	96-Loch Platte	0,1 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:50
	24-Loch Platte	0,6 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:12,5
	6-Loch Platte	5 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:5
	10 cm Schale	7 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:50
SW480	96-Loch Platte	0,1 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:40
	24-Loch Platte	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:12,5
	6-Loch Platte	6 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:4
	10 cm Schale	12 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:40
HeLa	96-Loch Platte	0,05 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:50
	24-Loch Platte	0,4 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:12,5
	6-Loch Platte	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:5
	10 cm Schale	4 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Loch	1:50

### 3.2.2.3 Zelllysate aus eukaryotischen Zellen

In dieser Arbeit wurden Lysate aus eukaryotischen Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers hergestellt. Dazu wurden die in 96-Loch Platten kultivierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend fünf Minuten mit 20 µl Lysepuffer pro Loch auf Eis inkubiert. Danach wurden die lysierten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C inkubiert und konnten anschließend für eine SDS-PAGE eingesetzt werden (siehe Abschnitt 3.2.5.1).

### 3.2.2.4 BrdU Assay

Zur Bestimmung der DNA Syntheserate wurde in dieser Arbeit das Kit „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben verwendet. Für diesen Assay werden Zellen mit einer BrdU Lösung (5-Bromo-2'-deoxyuridin) behandelt. Bei BrdU handelt es sich um ein Pyrimidin Analogon, welches statt Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Das eingebaute BrdU kann mit Hilfe eines anti-BrdU-Peroxidase Antikörpers in fixierten Zellen mit partiell denaturierter DNA nachgewiesen und mit einem ELISA-Photometer gemessen werden. Die gemessenen Werte

korrelieren dabei direkt mit der DNA Syntheserate. Die Untersuchung der DNA Syntheserate erfolgte zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA.

### **3.2.2.5 Caspase-3/7 Assay**

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Apoptoserate das Kit „Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase-3/7 Assay“ (Promega) verwendet und nach Herstellerangaben genutzt. Dieses enthält neben einem Lyse- und Permeabilisierungspuffer für die Zellen ebenfalls das Caspase-3/7 Substrat Z-DEVD-R110 (bis-N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Asparaginsäureamid). Durch Abspaltung des DEVD Peptids durch die Caspasen 3 und 7 wird Rhodamin 110 freigesetzt. Rhodamin 110 hat ein Emissionsmaximum von 521 nm und kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Plattenlesers gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert hierbei mit der Aktivität der Caspasen 3 und 7, so dass eine Aussage über die Apoptoserate einer Zellpopulation möglich ist. Die Apoptoserate wurde in dieser Arbeit sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit siRNA bestimmt.

### **3.2.2.6 MTT Assay**

Mit Hilfe eines MTT Assays kann die Lebensfähigkeit von Zellen untersucht werden. In dieser Arbeit wurde das „Cell Proliferation Kit I (MTT)“ (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Assay beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) in lilafarbene Formazankristalle durch stoffwechselaktive Zellen. Die zelluläre Reduktion beinhaltet die Kofaktoren NADH und NADPH. Die Formazankristalle werden gelöst und die Farbintensität kann anschließend mit einem ELISA-Photometer gemessen werden. Die gemessenen Werte korrelieren dabei mit der Anzahl stoffwechselaktiver und damit lebender Zellen. Die Analyse der Lebensfähigkeit erfolgte in dieser Arbeit 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit siRNA.

### 3.2.2.7 Transwell-Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migrationsrate wurde in dieser Arbeit das Kit „QCM™ Chemotaxis 96-well Cell Migration Assay“ (Millipore) nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Assay beruht darauf, dass Zellen, die unter Serumentzug kultiviert wurden, durch eine Membran mit einer Porengröße von 8 µm wandern. Auf der anderen Seite der Membran befindet sich Medium, welches als Lockmittel 10% fötales Kälberserum enthält. Nach Ablösen der Zellen von der Membran werden diese lysiert und mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Fluoreszenzintensität kann mit einem Fluoreszenz-Plattenleser gemessen werden und korreliert mit der Anzahl der gewanderten Zellen. In dieser Arbeit wurde der Migrationsassay 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit siRNA begonnen. Die Zellen wurden für zwölf Stunden mit dem serumhaltigen Medium inkubiert.

### 3.2.2.8 Trypanblaufärbung

Mit Hilfe von Trypanblau kann die Vitalität von Zellen überprüft werden. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Azofarbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Aufgrund seiner Größe ( $M = 960,8 \text{ g/mol}$ ) kann Trypanblau die intakte Membran lebender Zellen nicht passieren und färbt somit selektiv tote Zellen, deren Membran durchlässig geworden ist. Tote Zellen werden tiefblau angefärbt, während lebende Zellen im Mikroskop hell erscheinen. In dieser Arbeit wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin-EDTA für zwei Minuten bei RT mit einer 0,4%igen Trypanblaulösung (Sigma Aldrich) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Minuten bei  $2500 \times g$  in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus) zentrifugiert und das Pellet wurde in  $20 \mu\text{l}$  der Färbelösung aufgenommen. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Der Anteil nekrotischer Zellen wurde durch den Quotienten aus der Anzahl blauer Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl ermittelt. Durch Multiplikation mit 100 konnte der prozentuale Anteil lebender Zellen nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Anteil nekrotischer Zellen [\%]} = \frac{100 \times \text{Anzahl blauer Zellen}}{\text{Anzahl blaue Zellen} + \text{Anzahl weiße Zellen}}$$

### 3.2.2.9 VEGF ELISA

Zur Bestimmung des VEGF Proteingehalts in VEGF siRNA behandelten Zellen wurde in dieser Arbeit der „Quantikine® Human VEGF“ (R&D Systems) ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) nach Herstellerangaben verwendet. In diesem Assay befindet sich ein auf Mikrotiterplatten immobilisierter monoklonaler anti-VEGF Antikörper. Im Medium vorhandenes VEGF kann an diesen binden. Nach einem Waschschrift wird das nun gebundene VEGF durch einen polyklonalen, HRPO-gekoppelten VEGF Antikörper erkannt. Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe des Enzymsubstrats kann die Farbentwicklung mit Hilfe eines ELISA-Photometers gemessen werden. Die gemessenen Werte korrelieren dabei mit der VEGF Menge, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Untersuchung des VEGF Proteingehaltes im Zellkulturüberstand erfolgte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit VEGF siRNA.

### 3.2.2.10 Wundheilungsassay

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Migrationsrate von HeLa Zellen ebenfalls ein eindimensionaler Wundheilungsassay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 3,5 cm Gewebekulturschalen mit einem Gitter auf der Schalenunterseite kultiviert (Nunc). Das Gitter hatte einen Abstand von 2 mm. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion der HeLa Zellen mit siRNA wurde der konfluente Monolayer mit Hilfe einer Plastikspitze gekratzt, so dass ein etwa 100 – 150 µm breiter zellfreier Spalt entstand. Darauf folgte ein Medienwechsel, um abgelöste Zellen zu entfernen. Der betreffende Spalt wurde im selben Gitterabschnitt in einem Abstand von einer Stunde über 14 Stunden lichtmikroskopisch verfolgt (Leitz Labovert) und fotografiert. Auf diese Weise konnte die Migrationsgeschwindigkeit siRNA behandelter HeLa Zellen bestimmt werden.

## 3.2.3 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden alle Präparate auf Objektträgern mit “Dako fluorescent mounting medium“ (Dako Cytomation) eingebettet. Die jeweilige Färbung der auf Deckgläschen kultivierten Zellen erfolgte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA. Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Farbstoffe oder Antikörper erfolgten die Inkubationsschritte unter Lichtausschluss. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) und der Software Axiovision Release 4.6.3 (Zeiss).

Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

**Tab. 3.11: Anregungs- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen für die Immunzytochemie.** Cy3: Indocarbocyanin; DAPI: 4,6-Diamidino-2-phenylindol; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat; TRITC: Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat.

Fluoreszenzmarker	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Cy3	552 nm	565 nm
DAPI	360 nm	450 nm
FITC	495 nm	519 nm
TRITC	550 nm	570 nm
MitoTracker <sup>®</sup> Green FM	490 nm	516 nm

### 3.2.3.1 Fixieren von Zellen mit Formaldehyd

In dieser Arbeit wurden die Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse mit Formaldehyd fixiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten in frischer 3,7%iger Formaldehydlösung in PBS bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

### 3.2.3.2 Färbung der Zellkerne mit DAPI

Bei DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) handelt es sich um einen DNA-bindenden Farbstoff, der unter UV-Anregung blaues Licht emittiert. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung der Zellkerne mit DAPI (0,05 µg/ml in PBS) für fünf Minuten bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wie oben beschrieben eingebettet.

### 3.2.3.3 Färbung eukaryotischer Zellen mit MitoTracker<sup>®</sup> Green FM

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte in dieser Arbeit mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (Molecular Probes). Dieser Farbstoff hat die Eigenschaft in die Membran von Mitochondrien zu interkalieren und erst durch die Wechselwirkung mit den Lipiden zu fluoreszieren. Durch die Färbung mit MitoTracker<sup>®</sup> Green FM kann die mitochondriale Masse und damit die Ausdehnung des mitochondrialen Netzwerks bestimmt werden. Dazu wurden in dieser Arbeit auf Deckgläschen kultivierte Zellen mit 200 nM



MitoTracker<sup>®</sup> Green FM in DMSO behandelt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten in frischer 3,7%iger Formaldehydlösung in PBS bei RT fixiert und anschließend mit Medium gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für fünf Minuten bei – 20°C mit einer eiskalten Aceton/Methanol (1:1) Lösung. Nach dem Abnehmen der Lösung und Trocknen der Deckgläschen für zehn Minuten bei RT erfolgte eine Markierung der Zellkerne mit DAPI wie in Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben.

#### **3.2.3.4 Färbung eukaryotischer Zellen mit Phalloidin/TRITC**

Mit Hilfe der Phalloidin Färbung kann das Aktinzytoskelett von Zellen untersucht werden. Bei Phalloidin handelt es sich um ein toxisches Peptid des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das mit hoher Affinität an polymerisiertes Aktin bindet. Ist es mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, kann das Aktinzytoskelett der Zelle angefärbt werden. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde TRITC (Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat) gekoppeltes Phalloidin verwendet. Dazu wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen zunächst wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben fixiert und anschließend 15 Minuten mit 1%iger Magermilchlösung in PBS blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit Phalloidin/TRITC (1:1000 in PBS/T verdünnt) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/T wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben mit DAPI gefärbt und weiterbehandelt.

#### **3.2.3.5 Immunzytochemische Färbung eukaryotischer Zellen mit Antikörpern**

Mit Hilfe dieser Methode kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle untersucht werden. Zur immunzytochemischen Markierung wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem gegen das Protein gerichteten Erstantikörper und danach mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper behandelt, welcher den ersten Antikörper spezifisch erkennt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in Tabelle 3.12 dargestellt und die jeweiligen Protokolle sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

**Tab. 3.12: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immunzytochemie Cy3: Indocarbocyanin**

Antikörper	Hersteller	Organismus	Verdünnung
anti-Ki-67	Dako Cytomation	Maus	1:50
anti-E-Cadherin	Dianova	Maus	1:100
anti- $\beta$ -Tubulin	Sigma Aldrich	Maus	1:200
anti-Vinculin	Sigma Aldrich	Maus	1:400
anti-Maus-Cy3	Dianova	Ziege	1:100

### 3.2.3.5.1 Färbung eukaryotischer Zellen mit anti-Ki-67

Bei Ki-67 handelt es sich um ein nukleäres Protein, das in allen aktiv proliferierenden Zellen synthetisiert wird. Es ist lediglich in der G<sub>0</sub> Phase nicht zu finden. Aufgrund dessen wurde dieses Protein hier als Proliferationsmarker verwendet. Zur Ki-67-Markierung wurden die Zellen nach der Fixierung (siehe Abschnitt 3.2.3.1) zehn Minuten bei – 20°C mit einer eiskalten Aceton/Methanol (1:1) Lösung permeabilisiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Deckgläschen etwa zehn Minuten bei RT getrocknet. Zur Verhinderung von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen 20 Minuten mit einer 2%igen BSA Lösung in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Erstantikörper anti-Ki-67 behandelt. Dazu wurde dieser in der Blockierlösung 1:50 verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils zehn Minuten wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper anti-Maus-Cy3 inkubiert, welcher in der Blockierlösung in einer Verdünnung von 1:100 vorlag. Nach einem erneuten Waschritt wie oben beschrieben wurden die Zellkerne mit DAPI wie in Abschnitt 3.2.3.2 dargestellt gefärbt und anschließend eingebettet.

### 3.2.3.5.2 Färbung eukaryotischer Zellen mit anti-E-Cadherin

Bei E-Cadherin handelt es sich um ein Zellmembranprotein, das an der Ausbildung von Zell-Zellkontakten beteiligt ist. In dieser Arbeit wurden die Zellen nach Fixierung (siehe Abschnitt 3.2.3.1) für zehn Minuten mit einer 1%igen Triton x-100 Lösung in PBS zur Permeabilisierung inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen mit Hilfe einer 2%igen BSA Lösung in PBS für 30 Minuten bei RT. Der ungekoppelte anti-E-Cadherin Erstantikörper wurde in der Blockierlösung 1:100 verdünnt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach zweimaligem

Waschen mit PBS für jeweils zehn Minuten erfolgte die Markierung der Zellen mit dem Zweitantikörper anti-Maus-Cy3 in einer 1:100 Verdünnung in der Blockierlösung für eine Stunde bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und eingebettet (siehe Abschnitt 3.2.3.2).

### **3.2.3.5.3 Färbung eukaryotischer Zellen mit anti- $\beta$ -Tubulin**

Beta-Tubulin ist ein Teil des Zellzytoskeletts, so dass mit Hilfe dieses Antikörpers die Zellmorphologie analysiert werden kann. Dazu wurden die Zellen in dieser Arbeit zunächst wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben fixiert. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindestellen mit Hilfe einer 1%igen Magermilchlösung in PBS für 20 Minuten bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper anti- $\beta$ -Tubulin erfolgte in einer 1:200 Verdünnung in PBS/T für eine Stunde bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal jeweils zehn Minuten mit PBS/T gewaschen und danach eine Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper anti-Maus-Cy3 inkubiert. Dieser wurde in einer 1:100 Verdünnung in PBS/T verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils zehn Minuten wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben weiterbehandelt.

### **3.2.3.5.4 Kofärbung eukaryotischer Zellen mit Vinculin-Phalloidin/FITC**

Bei Vinculin handelt es sich um ein Protein, das an der Ausbildung von Zell-Zell- sowie Zell-Substrat Kontakten beteiligt ist. Es verbindet Proteine der Fokaladhäsionen mit dem Aktinzytoskelett. Aus diesem Grund wurde hier eine Kofärbung von Vinculin und Phalloidin/FITC durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3.4). Dazu wurden die Zellen nach Fixierung (siehe Abschnitt 3.2.3.1) für fünf Minuten mit einer 0,2%igen Triton x-100 Lösung in PBS bei RT permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, einmal davon für fünf Minuten. Zunächst wurden die Zellen 20 Minuten bei RT in einer 2%igen BSA Lösung in PBS inkubiert, wodurch unspezifische Antikörperbindestellen blockiert wurden. Anschließend erfolgte die Markierung mit dem Erstantikörper anti-Vinculin für eine Stunde bei RT. Dieser wurde in einer 1:400 Verdünnung in der Blockierlösung eingesetzt. Nach einem Waschschrift wie oben beschrieben wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit einer 1:1000 in Blockierlösung verdünnten Phalloidin/FITC Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper anti-Maus-Cy3 (1:100 in Blockierlösung) für eine

Stunde bei RT. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und anschließend wie in Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben weiterbehandelt.

### 3.2.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand spezifischer Eigenschaften unterscheiden, quantifizieren und separieren. Zu diesen Eigenschaften zählen Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazelluläre Protein- und Organellenausstattung. Für eine solche Messung können Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Markierte Zellen werden von einem Laserstrahl erfasst, wodurch es zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe kommt, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Durch ein System aus Spiegeln und Filtern wird dieses Licht gebündelt und zerlegt. Jedes Fluorochrom erzeugt dabei ein spezifisches Signal. In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, um verschiedene intrazellulärer Komponenten zu analysieren. Hierzu zählten die Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung (siehe Abschnitt 3.2.4.1), sowie die Bestimmung der Mitochondrienmasse und des Aktinzytoskeletts mit Hilfe der Farbstoffe MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (siehe Abschnitt 3.2.4.3) und Phalloidin/FITC (siehe Abschnitt 3.2.4.4). Für die Analysen mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen kultiviert und zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit siRNA geerntet. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen untersucht. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

**Tab. 3.13: Anregungs- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen für die Durchflusszytometrie.** FITC: Fluorescein-Isothiocyanat.

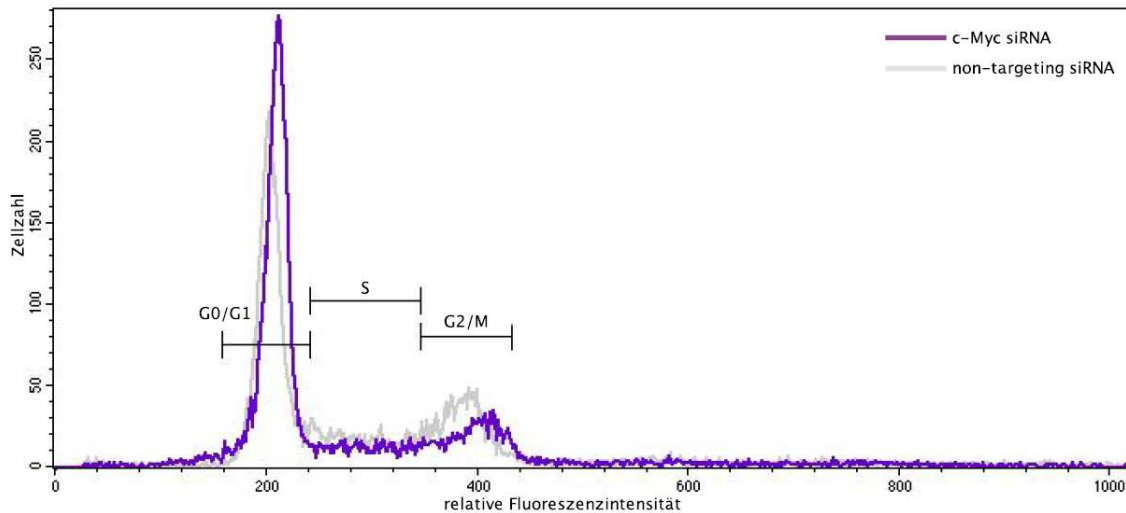
Fluoreszenzmarker	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Propidiumiodid	535 nm	617 nm
MitoTracker <sup>®</sup> Green FM	490 nm	516 nm
Phalloidin/FITC	495 nm	519 nm

### 3.2.4.1 Propidiumiodidfärbung zur Zellzyklusanalyse

In dieser Arbeit wurden die Zellen zur Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid gefärbt. Bei Propidiumiodid (PI) handelt es sich um einen DNA-bindenden, rot fluoreszierenden Farbstoff. Die Fluoreszenz einer PI-gefärbten Zelle ist proportional zu ihrem DNA Gehalt, so dass die Fluoreszenzintensität genutzt werden kann, um den DNA Gehalt und damit das Zellzyklusstadium einer Zelle beziehungsweise einer Zellpopulation zu bestimmen. Das Fluoreszenzsignal von PI-gefärbten Zellen mit tetraploidem Chromosomensatz ( $4n$ ) in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus ist doppelt so stark wie das der Zellen mit normalem, diploidem Chromosomensatz ( $2n$ ) in der  $G_1$ -Phase. Bei Zellen, die sich in der S Phase befinden, liegt das Fluoreszenzsignal zwischen denen der  $G_1$ - und der  $G_2/M$ -Phase. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann das Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Zelle bestimmt werden. So ist es möglich, die prozentuale Verteilung von Zellen einer Zellpopulation in den verschiedenen Zellzyklusstadien anzugeben. Apoptotische Zellen zeigen sich hierbei als Sub- $G_1$  Population.

Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen zunächst mit Trypsin-EDTA abgelöst und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 rpm (TechnoSPIN, Sorvall) wurde das Pellet in PBS aufgenommen, resuspendiert und die Zellen wurden gezählt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in der gleichen Menge PBS aufgenommen und  $1 \times 10^6$  Zellen wurden abgenommen. Diese wurden nach einem weiteren Waschschrift mit PBS in 500  $\mu$ l Lysepuffer für Zellzyklusanalyse aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit 5  $\mu$ l RNase (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) und 5  $\mu$ l Propidiumiodid (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) behandelt und eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung mit dem Gerät FACS Calibur (Becton Dickinson). Die Auswertung wurde mit der Software CellQuest™ Pro (Becton Dickinson) durchgeführt.

In Abbildung 3.1 ist exemplarisch die Überlagerung der Zellzyklusanalyse von c-Myc siRNA- und non-targeting siRNA behandelten SW480 Zellen dargestellt. In diesem Histogramm wurde die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Die relative Fluoreszenzintensität von 200 entspricht einem DNA Gehalt von  $2n$  und repräsentiert somit Zellen, die sich in der  $G_0/G_1$ -Phase befinden, während eine relative Fluoreszenzintensität von 400 Zellen in der  $G_2/M$ -Phase mit einem DNA Gehalt von  $4n$  bezeichnet. Zwischen diesen befinden sich Zellen in der S-Phase des Zellzyklus.



**Abb. 3.1: Exemplarische Darstellung einer Zellzyklusanalyse.** Im Histogramm wurde die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Mit non-targeting siRNA behandelte Kontrollzellen sind grau hinterlegt, während mit c-Myc siRNA transfizierte SW480 Zellen in lila dargestellt sind.

### 3.2.4.2 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des „BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit“ (BD Bioscience). Die Behandlung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 3.2.4.3 MitoTracker® Green FM Färbung zur Bestimmung der Mitochondrienmasse

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker® Green FM wurde in dieser Arbeit die Mitochondrienmasse analysiert (siehe Abschnitt 3.2.3.3). Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben mit dem Farbstoff inkubiert und danach mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Ein Teil der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 rpm (TechnoSPIN, Sorvall) wurde das Pellet in der gleichen Menge PBS aufgenommen und resuspendiert. Davon wurden  $1 \times 10^6$  Zellen abgenommen und nach einem erneuten Waschschrift mit PBS fixiert (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Anschließend erfolgte die Messung mit dem Gerät LSRII (Becton Dickinson). Die Auswertung wurde mit der Software FlowJo (TreeStar Inc.) durchgeführt.

#### **3.2.4.4 Phalloidin/FITC Färbung zur Bestimmung des F-Aktin Gehalts**

Zur Analyse des Aktinzytoskeletts wurde in dieser Arbeit das toxische Peptid Phalloidin eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.3.4), welches für die Durchflusszytometrie FITC-gekoppelt war. Die in 10 cm Gewebekulturschalen kultivierten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl und Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 rpm (TechnoSPIN, Sorvall), wurde das Pellet in der gleichen Menge PBS aufgenommen und gelöst. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen erneut mit PBS gewaschen und fixiert (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit einer 600 nM Phalloidin/FITC Lösung in PBS für zehn Minuten bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Darauf wurde ein weiterer Waschschrift mit PBS durchgeführt. Schließlich wurden die fixierten und gefärbten Zellen mit Hilfe des Gerätes LSRII (Becton Dickinson) untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (TreeStar Inc.).

### **3.2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

In dieser Arbeit erfolgte zur analytischen Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Shapiro *et al.*, 1967) mit diskontinuierlichem Puffersystem. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele sowie zur Elektrophorese wurde ein Mini-Gelsystem (BioRad) mit vertikalen Gelkammern verwendet. Die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele sind in Tabelle 3.14 aufgelistet. Die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu trennenden Proteine. Die Proben für die SDS-PAGE wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C vollständig denaturiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein geeigneter Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 200 Volt.

**Tab. 3.14: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele zur SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.**

APS: Ammoniumpersulfat; TEMED: Tetramethylethylendiamin.

Reagenzien	Sammelgel	Trenngel		
		15%	12,5%	7,5%
Acrylamid 30%	0,65 ml	3,75 ml	3,125 ml	1,875 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	-
Trenngelpuffer	-	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
Wasser	3,1 ml	1,875 ml	2,475 ml	3,7 ml
TEMED	0,01ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
APS 10%	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

### 3.2.5.2 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots (Renart *et al.*, 1979) können auf einer Membran immobilisierte Proteine spezifisch nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde der Proteintransfer von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran nach dem Elektroblobverfahren in einer Halbtrockenzelle (Biometra) durchgeführt. Dazu wurden zunächst auf die Anodenplatte zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Dann wurde eine PVDF-Membran (GE Healthcare) in Gelgröße zur Aktivierung etwa zwei Minuten in Methanol getränkt und anschließend luftblasenfrei auf die Whatmanpapiere positioniert. Darauf wurde das in Transferpuffer befeuchtete SDS-Gel gelegt. Den Abschluss bildeten wiederum zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere. Die Kathodenplatte auf der Oberseite wurde während des dreißigminütigen Elektrotransfers mit einem Kühlakku bedeckt. Dabei wurde pro cm<sup>2</sup> SDS-Gel eine Stromstärke von 5 mA eingestellt. Durch den in der SDS-PAGE verwendeten Prestained Protein Standard konnte der Proteintransfer auf die Membran verfolgt werden.

### 3.2.5.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Dabei wurde ein primärer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein im zweiten Schritt von einem sekundären Antikörper erkannt. An letzteren war kovalent das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelt, so dass durch die Aktivität der Peroxidase das Protein nachgewiesen werden konnte.

Dazu wurden nach dem Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran alle freien Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in einer Blockierlösung (5% Magermilch in



PBS/T oder TBS/T) unter leichtem Schütteln abgesättigt. Dies erfolgte entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Dieser befand sich in einer für den Antikörper speziellen Verdünnung in der Blockierlösung. Nach einem dreimaligen Waschschrift in PBS/T beziehungsweise TBS/T von jeweils zehn Minuten erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. In Tabelle 3.15 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen dargestellt.

**Tab. 3.15: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die immunologische Nachweisreaktionen.**

Antikörper	Hersteller	Blockierlösung	Verdünnung
anti-β-Aktin	Abcam	5% Magermilch in TBS/T	1:20000
anti-c-Myc	R&D Systems	5 % Magermilch in PBS/T	1:100
anti-Cyclin D1	Santa Cruz Biotechnology	5% Magermilch in TBS/T	1:500
anti-Kaninchen-HRPO	GE Healthcare	5% Magermilch in	1:10000
anti-Maus-HRPO	GE Healthcare	PBS/T oder TBS/T	1:20000

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das „ECL Plus Western Blotting Detection Kit“ (GE Healthcare) verwendet. Dabei wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) mit Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das Reaktionsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand, wobei die Energie durch Emission von Licht abgegeben wird. Dabei wird diese Chemilumineszenz durch so genannte Enhancer verstärkt. Das Emissionsmaximum liegt bei 428 nm und kann zur Belichtung von Röntgenfilmen genutzt werden. In dieser Arbeit wurde das ECL Chemilumineszenz Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Danach wurde die Membran in eine Folie gelegt und mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) bedeckt. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Signalintensität. Anschließend wurde der Film in eine Entwicklerlösung getaucht und einige Minuten in Fixierer gelegt. Nach diesen Schritten wurde der Film jeweils mit Wasser gespült. Abschließend wurde die Bandenstärke der Immunoblots mit Hilfe der Software AIDA Version 4.15 (Raytest) densitometrisch ausgewertet.

#### **3.2.5.4 „Strippen“ einer Membran**

Um die gleiche PVDF-Membran mit einem weiteren primären Antikörper zu untersuchen, wurden die zuvor verwendeten Antikörper durch „Strippen“ entfernt. Dazu wurde die Membran nach der Chemilumineszenzreaktion vier Minuten bei RT in dem Stripping Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Wasser gewaschen und für einen neuen immunologischen Nachweis in der entsprechenden Blockierlösung inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.5.3).

## 4. Ergebnisse

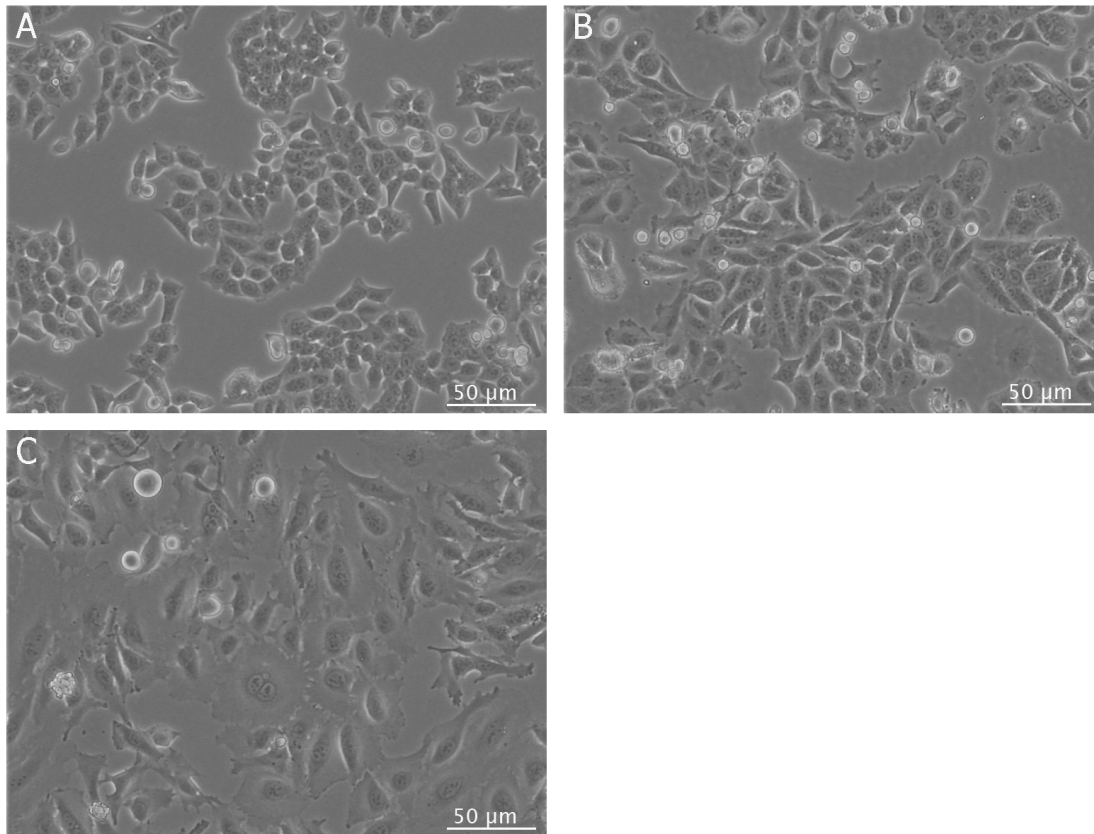
### 4.1 Die Modellsysteme

Als Modellsysteme wurden die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480 sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa verwendet. Der Wnt Signalweg ist in den ersten beiden Zelllinien konstitutiv aktiv, da  $\beta$ -Catenin durch verschiedene Mutationen stabilisiert ist.

In HCT116 Zellen fehlen drei Basen des  $\beta$ -Catenin Gens *CTNGB1*. Dies hat die Deletion von Serin 45 zur Folge, so dass der erste Schritt der sukzessiven Phosphorylierung durch CKI $\alpha/\epsilon$  nicht mehr stattfinden kann. Dies führt dazu, dass auch die drei weiteren konservierten Aminosäuren Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 nicht durch die Kinase GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden. Aufgrund dessen kann  $\beta$ -Catenin nicht ubiquitiniert und abgebaut werden. Darüber hinaus weisen HCT116 Zellen ein mutiertes *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) Gen auf. Aktivierende Mutationen von GTPasen der Ras Familie gehören zu den häufigsten genetischen Vorkommnissen in menschlichen Tumoren. Humane Tumoren, vor allem solche des Darms und der Lunge, weisen meist eine *KRAS* Mutation auf (Keller *et al.*, 2007). Die mit 55% in HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) häufigste hierbei ist die *missense*-Mutation G13D (Fujiwara *et al.*, 1998), die ebenfalls in HCT116 Zellen zu finden ist.

Wie bereits in der Einleitung erläutert (Abschnitt 1.2.1) besitzen SW480 Zellen lediglich ein *APC* Allel mit einer *nonsense*-Mutation in Kodon 1338. Dies hat ein verkürztes APC Protein zur Folge, das aus den Aminosäuren eins bis 1338 besteht. Diesem trunkierten APC fehlen zum größten Teil die  $\beta$ -Catenin-bindenden 20-Aminosäurewiederholungen sowie die drei Axin-Bindestellen (SAMP). Aufgrund dessen kann der Zerstörungskomplex nicht mehr gebildet und  $\beta$ -Catenin nicht mehr gebunden und phosphoryliert werden.

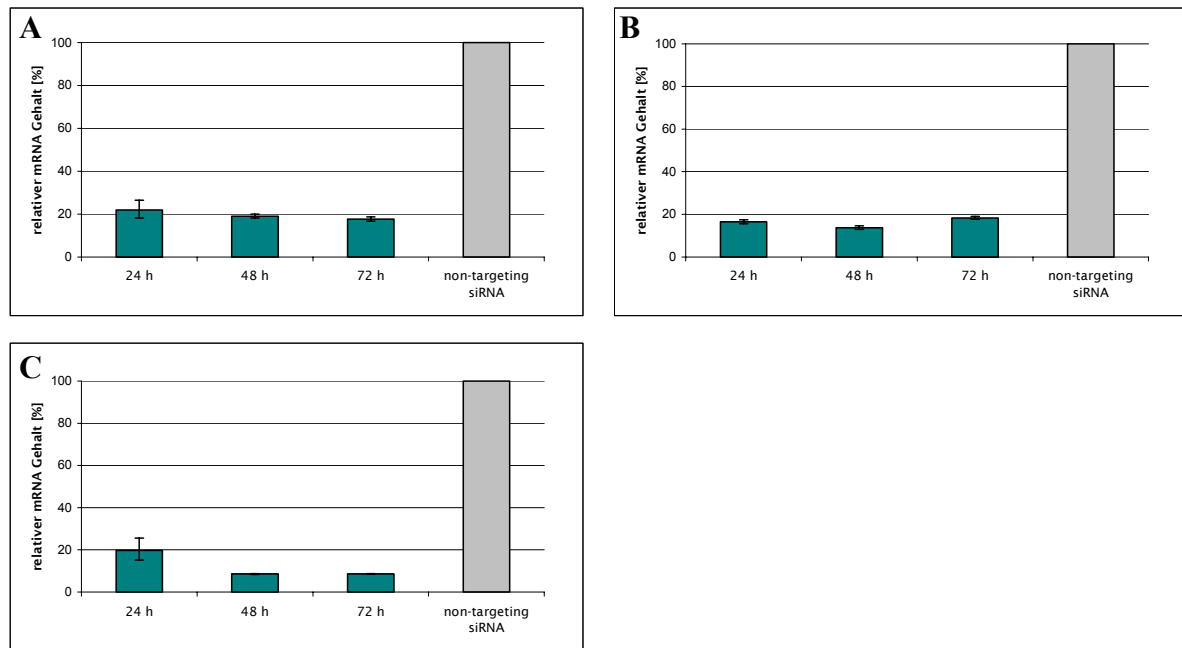
Bei HeLa Zellen handelt es sich um humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Sie sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert werden konnte und sind nach der 31-jährigen Patientin Henrietta Lacks benannt. HeLa Zellen sind mit dem humanen Papillomavirus-18 (HPV-18) infiziert und zeigen eine hohe Proliferationsrate. Zum einen ist in diesen Zellen das Tumorsuppressorprotein p53 durch ein virales Protein inaktiviert. Zum anderen trägt eine Mutation in der Humanen Leukozyten Antigen (HLA) Superfamilie auf Chromosom 6 zu ihrer Malignität bei. Die verwendeten Zelllinien sind in Abbildung 4.1 zu sehen.



**Abb. 4.1: Darstellung der verwendeten Modellsysteme. (A) Die kolorektale Karzinomzelllinie HCT116. (B) Die kolorektale Adenokarzinomzelllinie SW480. (C) Die Zervixkarzinomzelllinie HeLa. Zu sehen ist jeweils ein konfluenter *Monolayer*.**

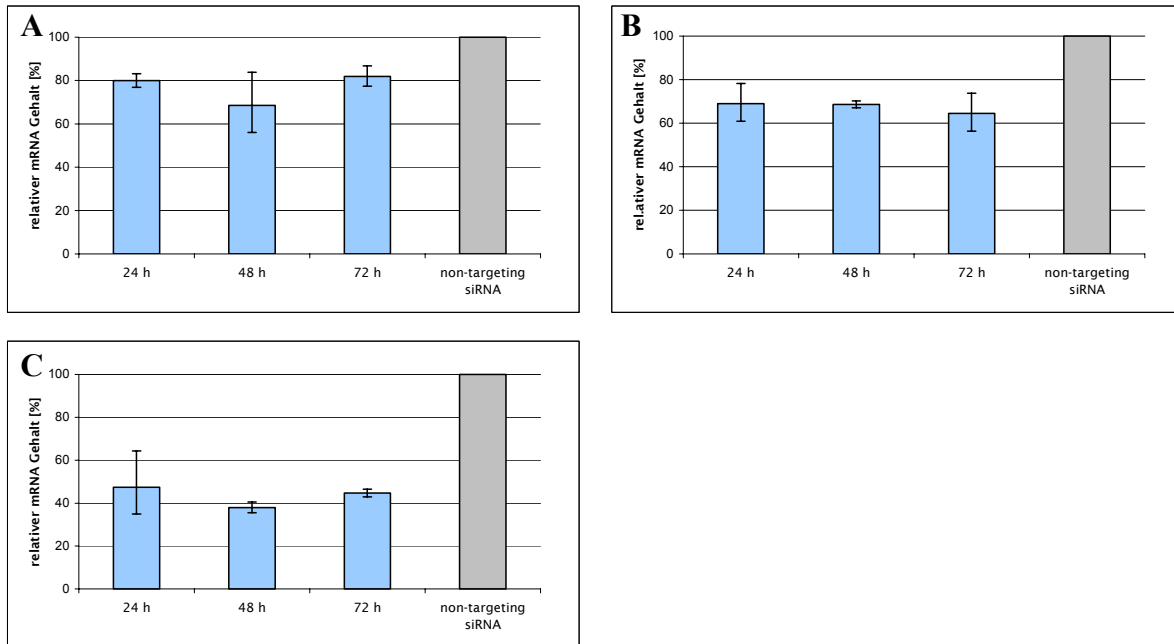
## 4.2. *CCND1*, *c-MYC* und *VEGF* als Zielgene des Wnt Signalwegs

Wie bereits in Abschnitt 1.3 erläutert, gibt es mit *Conductin/Axin2* (Jho *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002) und *SP5* (Weidinger *et al.*, 2005) nur wenige bekannte universell regulierte Zielgene (Clevers, 2006). Deshalb wurde zunächst überprüft, ob es sich bei den ausgewählten Genen *CCND1*, *c-MYC* und *VEGF* in den Zelllinien HCT116, SW480 und HeLa um Zielgene des Wnt Signalwegs handelt. Dazu wurde  $\beta$ -Catenin, das Schlüsselprotein des Wnt Signalwegs, mit Hilfe von siRNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten inaktiviert. Untersucht wurde die Zeitspanne zwischen 24 und 72 Stunden nach Transfektion, um auch langfristige Änderungen des mRNA Gehaltes zu erfassen. Die Verifizierung der Regulation auf mRNA Ebene erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT PCR, wie in Abbildung 4.2 zu sehen.



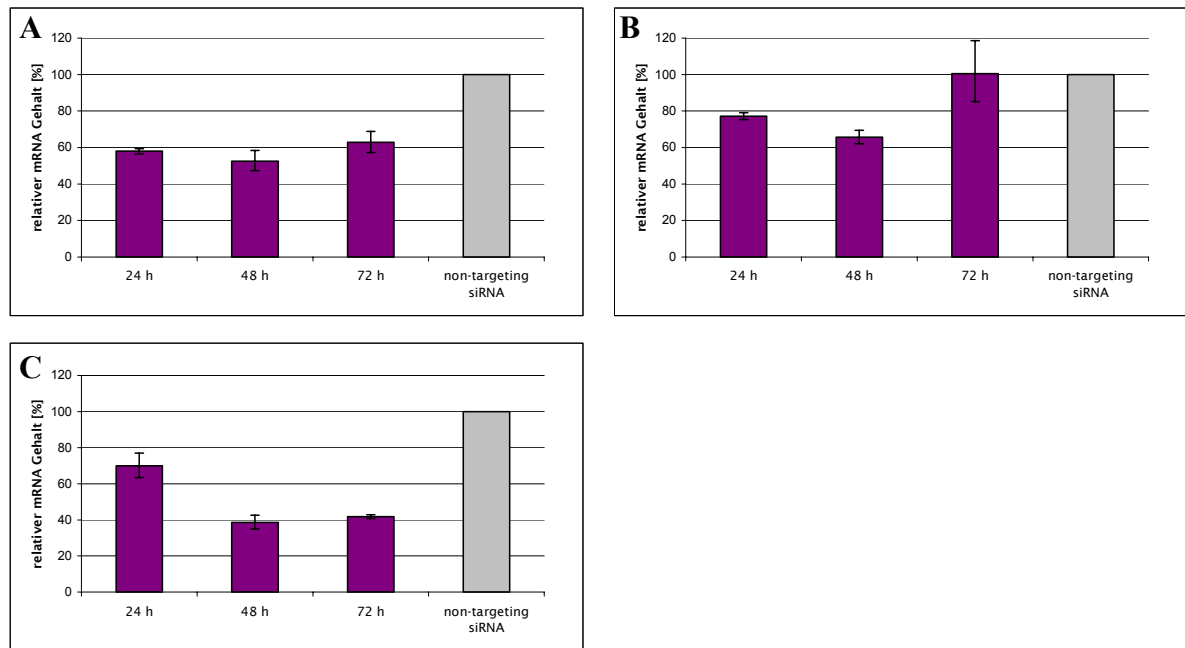
**Abb. 4.2: Darstellung der  $\beta$ -Catenin Inaktivierung auf mRNA Ebene (A) in HCT116 Zellen. (B) in SW480 Zellen. (C) in HeLa Zellen.** Zu sehen ist der relative  $\beta$ -Catenin mRNA Gehalt zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA. Der  $\beta$ -Catenin mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 2 (aus vier Ansätzen).

In allen getesteten Zelllinien wurde der  $\beta$ -Catenin mRNA Gehalt mittels  $\beta$ -Catenin siRNA um mindestens 80% gesenkt, in HeLa Zellen zu späteren Zeitpunkten sogar um 90%. Anschließend wurde mit Hilfe der quantitativer *real-time* RT PCR der mRNA Gehalt der ausgewählten Gene in den gleichen Ansätzen bestimmt. Dies ist in den folgenden Abbildungen zu sehen. Abbildung 4.3 zeigt den Cyclin D1-, Abbildung 4.4 den c-Myc- und Abbildung 4.5 den VEGF mRNA Gehalt.



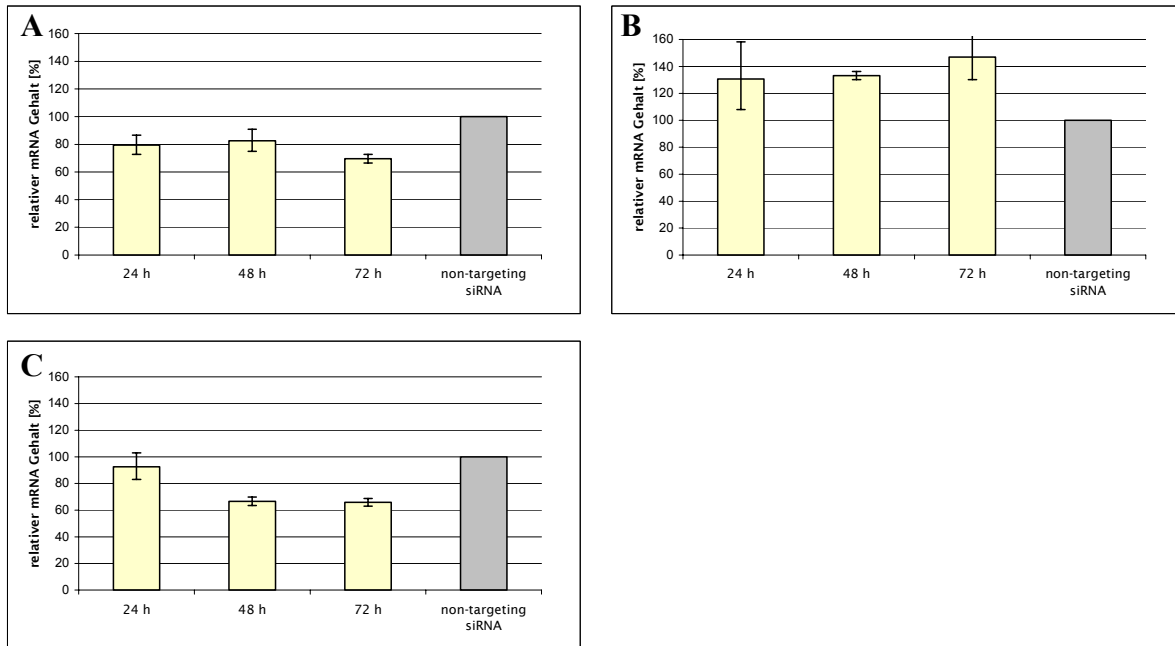
**Abb. 4.3: Der Cyclin D1 Gehalt auf mRNA Ebene nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung (A) in HCT116 Zellen. (B) in SW480 Zellen. (C) in HeLa Zellen.** Dargestellt ist der relative Cyclin D1 mRNA Gehalt zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA. Der Cyclin D1 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 2 (aus vier Ansätzen).

In HCT116 Zellen wurde der Cyclin D1 mRNA Gehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Hilfe der  $\beta$ -Catenin siRNA um etwa 20% gesenkt. Ähnliches war in SW480 Zellen zu beobachten, hier betrug die Verringerung der Cyclin D1 mRNA Menge zu den ausgewählten Zeitpunkten 30% verglichen mit *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. Der mit bis zu 60% Senkung größte Effekt wurde in HeLa Zellen beobachtet.



**Abb. 4.4: Einfluss von  $\beta$ -Catenin auf den c-Myc mRNA Gehalt (A) in HCT116 Zellen. (B) in SW480 Zellen. (C) in HeLa Zellen.** Gezeigt ist der relative c-Myc mRNA Gehalt zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA. Der c-Myc mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 2 (aus vier Ansätzen).

Der c-Myc mRNA Gehalt in HCT116 Zellen nach Behandlung mit  $\beta$ -Catenin siRNA zeigte eine Verringerung um 40% zu allen untersuchten Zeitpunkten. In SW480 wurde zunächst eine leichte Senkung des c-Myc mRNA Gehaltes um bis zu 40% und eine anschließende Normalisierung auf 100% zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion beobachtet. Der deutlichste Effekt war erneut in HeLa Zellen zu sehen. Hier führte die Transfektion der  $\beta$ -Catenin siRNA nach 24 Stunden zu einer Senkung um 30%, nach 48 beziehungsweise 72 Stunden sogar um 60%.



**Abb. 4.5:** Der VEGF Gehalt auf mRNA Ebene nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung (A) in HCT116 Zellen. (B) in SW480 Zellen. (C) in HeLa Zellen. Zu sehen ist der relative VEGF mRNA Gehalt zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA. Der VEGF mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 2 (aus vier Ansätzen).

In HCT116 Zellen war durch Behandlung mit  $\beta$ -Catenin siRNA nur ein leichter Rückgang des VEGF mRNA Gehaltes zu sehen. Lediglich nach 72 Stunden betrug die Senkung etwa 30%. In SW480 Zellen hingegen zeigte sich sogar eine Erhöhung der VEGF mRNA Menge um bis zu 50%. Im Gegensatz dazu konnte in HeLa Zellen eine Senkung des VEGF mRNA Gehaltes um etwa 40% zu den Zeitpunkten 48 Stunden und 72 Stunden nach Transfektion der  $\beta$ -Catenin siRNA verzeichnet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.



**Tab. 4.1: Verringerung des mRNA Gehaltes ausgewählter Gene nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung in verschiedenen Zelllinien.** Dargestellt ist die jeweilige mRNA Menge in Prozent mit Standardabweichung im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen der betreffende mRNA Gehalt 100% betrug.

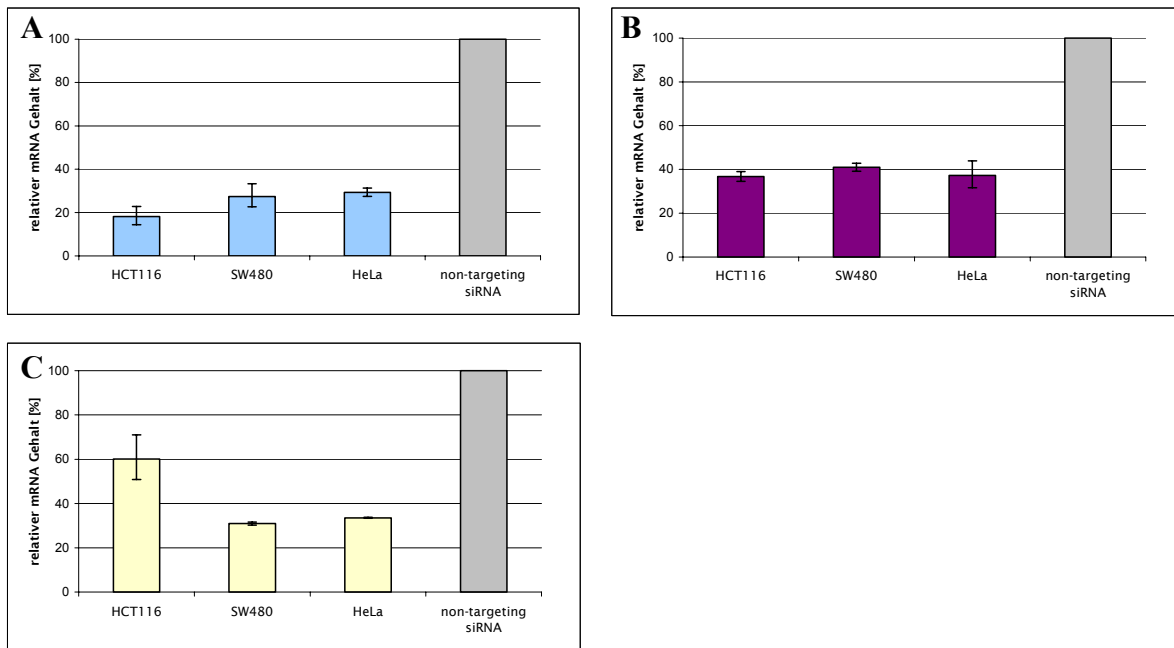
	<b>HCT116 Zellen</b>			
	$\beta$ -Catenin	Cyclin D1	c-Myc	VEGF
<b>24 Stunden</b>	22 $\pm$ 5	80 $\pm$ 3	58 $\pm$ 1	79 $\pm$ 7
<b>48 Stunden</b>	19 $\pm$ 1	69 $\pm$ 15	53 $\pm$ 6	83 $\pm$ 8
<b>72 Stunden</b>	18 $\pm$ 1	82 $\pm$ 5	63 $\pm$ 6	70 $\pm$ 3
	<b>SW480 Zellen</b>			
	$\beta$ -Catenin	Cyclin D1	c-Myc	VEGF
<b>24 Stunden</b>	17 $\pm$ 1	69 $\pm$ 9	77 $\pm$ 2	131 $\pm$ 28
<b>48 Stunden</b>	14 $\pm$ 1	69 $\pm$ 2	66 $\pm$ 4	133 $\pm$ 3
<b>72 Stunden</b>	18 $\pm$ 1	64 $\pm$ 9	100 $\pm$ 18	147 $\pm$ 19
	<b>HeLa Zellen</b>			
	$\beta$ -Catenin	Cyclin D1	c-Myc	VEGF
<b>24 Stunden</b>	20 $\pm$ 5	47 $\pm$ 17	70 $\pm$ 7	92 $\pm$ 11
<b>48 Stunden</b>	9 $\pm$ 0,5	38 $\pm$ 3	39 $\pm$ 4	67 $\pm$ 3
<b>72 Stunden</b>	9 $\pm$ 0,5	45 $\pm$ 2	42 $\pm$ 1	66 $\pm$ 3

Als nächstes sollten die ausgewählten Wnt Zielgene mittels RNA Interferenz analysiert werden. Die Regulation auf mRNA- und Proteinebene ist im folgenden Kapitel dargestellt.

## 4.3. Regulation der Wnt Zielgene mittels RNA Interferenz

### 4.3.1 Inaktivierung der Zielgene auf mRNA Ebene

Die Regulation der ausgewählten Zielgene des Wnt Signalwegs mit Hilfe der jeweiligen siRNA wurde zunächst auf mRNA Ebene etabliert. Die Überprüfung der Regulation erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT PCR und ist in Abbildung 4.6 zu sehen.



**Abb. 4.6: Inaktivierung der Wnt Zielgene in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf mRNA Ebene (A) nach Cyclin D1 siRNA Transfektion, (B) nach c-Myc siRNA Transfektion und (C) nach VEGF siRNA Transfektion.** Zu sehen ist der relative mRNA Gehalt zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der mRNA Gehalt der Zielgene in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3.

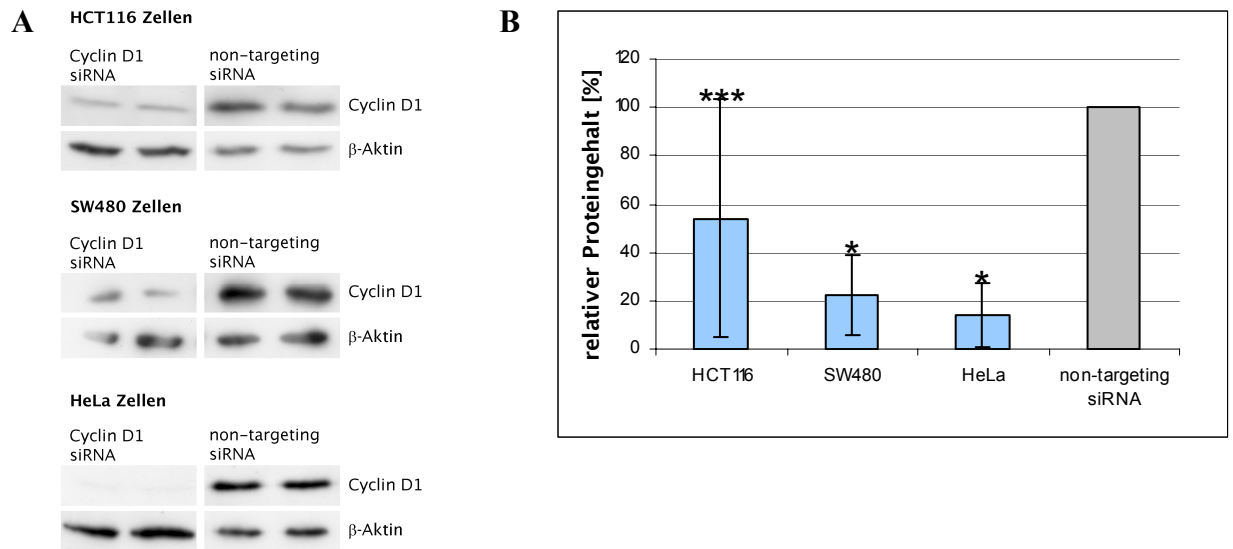
Cyclin D1 siRNA behandelte Zellen zeigten eine Senkung des Cyclin D1 mRNA Gehaltes um mindestens 70% in den verschiedenen Zelllinien, während die Verwendung der c-Myc siRNA zu einem Rückgang des c-Myc mRNA Gehaltes um etwa 60% führte. Dagegen hatte die Transfektion von VEGF siRNA eine Senkung des VEGF mRNA Gehaltes um 40% in HCT116 Zellen beziehungsweise etwa 70% in SW480 und HeLa Zellen zur Folge.

Als nächstes folgte die Etablierung der Regulation der ausgewählten Wnt Zielgene auf Proteinebene.

### 4.3.2 Inaktivierung der Zielgene auf Proteinebene

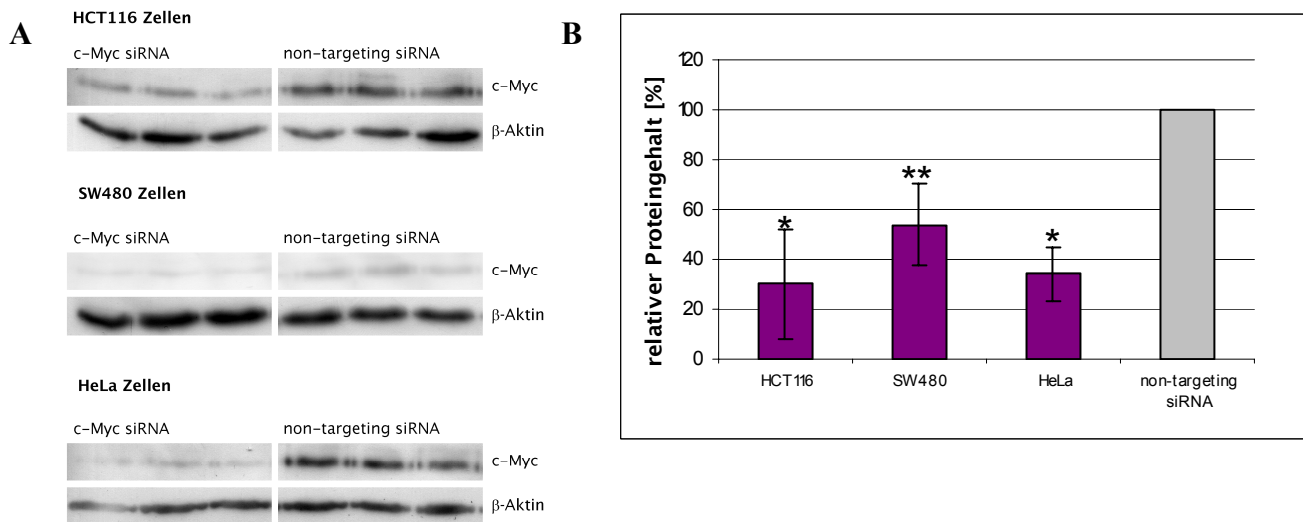
Die Überprüfung der Regulation der ausgewählten Wnt Zielgene auf Proteinebene erfolgte für Cyclin D1 und c-Myc mittels *Western Blot* und einer anschließenden densitometrischen Auswertung (siehe Abbildungen 4.7 und 4.8), während die Quantifizierung des VEGF Proteingehaltes mittels ELISA des Kulturmediums durchgeführt wurde (siehe Abbildung 4.9). Bei VEGF handelt es sich um einen löslichen Wachstumsfaktor, der von den Zellen in das

umgebende Medium sekretiert wird. Aus diesem Grund konnte der VEGF Proteingehalt nicht mittels *Western Blot* in siRNA behandelten Zelllysaten bestimmt werden.



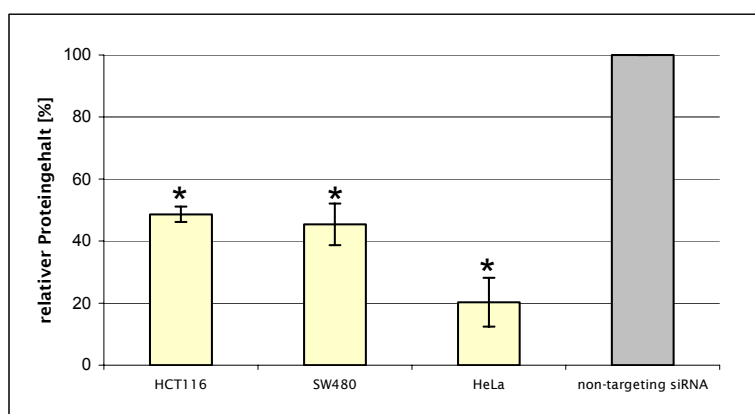
**Abb. 4.7: Regulation von Cyclin D1 in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf Proteinebene. (A) Cyclin D1 Inaktivierung im *Western Blot*. (B) Quantifizierung der Cyclin D1 Inaktivierung in der densitometrischen Auswertung.** Zur Bestimmung des relativen Cyclin D1 Proteingehalts zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Behandlung der Zellen mit Cyclin D1 siRNA wurde ebenfalls die Menge des Haushaltsproteins  $\beta$ -Aktin untersucht. Der Cyclin D1 Proteingehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,025$ .  $n = 8$  (HCT116 und HeLa Zellen);  $n = 38$  (SW480 Zellen).

Im *Western Blot* war in HCT116 Zellen eine deutliche Senkung des Cyclin D1 Proteingehaltes zu erkennen. Diese war jedoch in der densitometrischen Auswertung nicht reproduzierbar. Eine Aussage über die genaue Höhe des Rückgangs ist deshalb nicht möglich. In SW480 Zellen zeigte sich im *Western Blot* eine Senkung des Cyclin D1 Gehaltes. Die densitometrische Auswertung ergab, dass es sich um einen Rückgang um 80% handelte. In HeLa Zellen war ebenfalls ein Rückgang des Cyclin D1 Proteingehalts um etwa 80% zu beobachten.



**Abb. 4.8: Regulation von c-Myc in HCT116, SW480 und HeLa Zellen auf Proteinebene. (A) c-Myc Inaktivierung im *Western Blot*. (B) Quantifizierung der c-Myc Inaktivierung in der densitometrischen Auswertung.** Zur Bestimmung des relativen c-Myc Proteingehalts zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Behandlung der Zellen mit c-Myc siRNA wurde ebenfalls die Menge des Haushaltsproteins  $\beta$ -Aktin untersucht. Der c-Myc Proteingehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,005$ .  $n = 6$ .

Bei dem im Western Blot gezeigten Rückgang von c-Myc in HCT116 Zellen auf Proteinebene handelte es sich um eine Senkung im c-Myc Proteingehalt um 70%. In SW480 Zellen war ebenfalls eine Verringerung um etwa 50% im *Western Blot* zu erkennen. Der Rückgang des c-Myc Proteingehaltes in HeLa Zellen nach Transfektion von c-Myc siRNA betrug etwa 70%.



**Abb. 4.9: Regulation von VEGF auf Proteinebene in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Zu sehen ist der relative VEGF Proteingehalt in Prozent zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Behandlung der Zellen mit VEGF siRNA, bestimmt mittels ELISA des Kulturmediums. Der Proteingehalt von VEGF in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,001$ .  $n = 8$ .

Die Quantifizierung des VEGF Proteingehalts in den verschiedenen Zelllinien ergab einen Rückgang um mindestens 50%. In HeLa Zellen betrug die Senkung etwa 80%.

### 4.3.3 Zusammenfassung der Regulation mittels RNA Interferenz

Die Ergebnisse der Inaktivierung der jeweiligen Zielgene sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

**Tab. 4.2: Verringerung des mRNA- und Proteingehalts der Wnt Zielgene mittels RNA Interferenz.** Dargestellt ist der betreffende mRNA- beziehungsweise Proteingehalt in Prozent mit Standardabweichung im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,025$ .

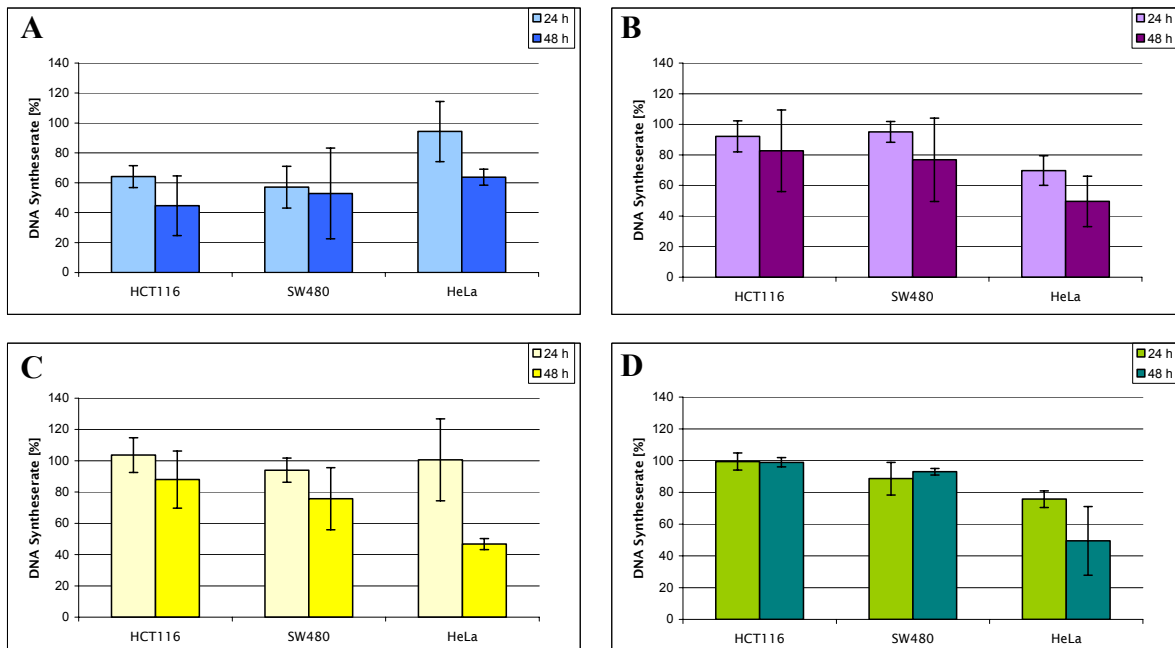
	Cyclin D1		c-Myc		VEGF	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
<b>HCT116 Zellen</b>	18 ± 5	54 ± 49 ***	37 ± 2	30 ± 22 *	60 ± 11	49 ± 2 *
<b>SW480 Zellen</b>	27 ± 6	22 ± 16 *	41 ± 2	54 ± 16 **	31 ± 1	45 ± 8 *
<b>HeLa Zellen</b>	29 ± 2	14 ± 13 *	37 ± 7	34 ± 11 *	34 ± 0,5	20 ± 10 *

## 4.4 Regulation der Zellproliferation durch den Wnt Signalweg

Der Wnt Signalweg selbst und die ausgewählten Zielgene Cyclin D1, c-Myc und VEGF spielen eine wichtige Rolle in der Zellproliferation. Aus diesem Grund wurde dieser Prozess eingehend untersucht.

### 4.4.1 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die DNA Synthese

Zunächst wurde die DNA Syntheserate mittels eines BrdU Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 zu sehen.



**Abb. 4.10: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die DNA Syntheserate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Zu sehen ist die relative DNA Syntheserate zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der betreffenden siRNA. Die DNA Syntheserate in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 16 (Ausnahmen: HeLa zum Zeitpunkt 24 Stunden: n = 8;  $\beta$ -Catenin siRNA behandelte Zellen: n = 5).

Die Verwendung von Cyclin D1 siRNA führte in HCT116 und SW480 Zellen bereits nach 24 Stunden zu einem signifikanten Rückgang der DNA Syntheserate. In HeLa Zellen war dies erst nach 48 Stunden der Fall. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit c-Myc siRNA lediglich in HeLa Zellen eine Senkung der DNA Syntheserate zur Folge, wobei sich dieser Effekt nach 48 Stunden noch verstärkte. In HCT116 und SW480 Zellen war kein Effekt zu beobachten. Auch die Transfektion von VEGF siRNA führte nur in HeLa Zellen zu einem Rückgang der DNA Syntheserate nach 48 Stunden. Die Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit  $\beta$ -Catenin siRNA hatte ebenfalls lediglich in HeLa Zellen einen Rückgang der DNA Syntheserate zur Folge. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

**Tab. 4.3: DNA Synthese in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist die relative DNA Syntheserate in Zellen mit der jeweiligen siRNA in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. In diesen betrug die DNA Syntheserate 100%.

	HCT116 Zellen		SW480 Zellen		HeLa Zellen	
	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	64 ± 7	45 ± 20	57 ± 14	53 ± 30	94 ± 20	64 ± 5
<b>c-Myc siRNA</b>	92 ± 10	83 ± 27	95 ± 7	77 ± 27	70 ± 10	50 ± 16
<b>VEGF siRNA</b>	104 ± 11	88 ± 18	94 ± 8	76 ± 20	101 ± 26	47 ± 4
<b>β-Catenin siRNA</b>	99 ± 5	99 ± 3	89 ± 10	93 ± 2	76 ± 5	49 ± 22

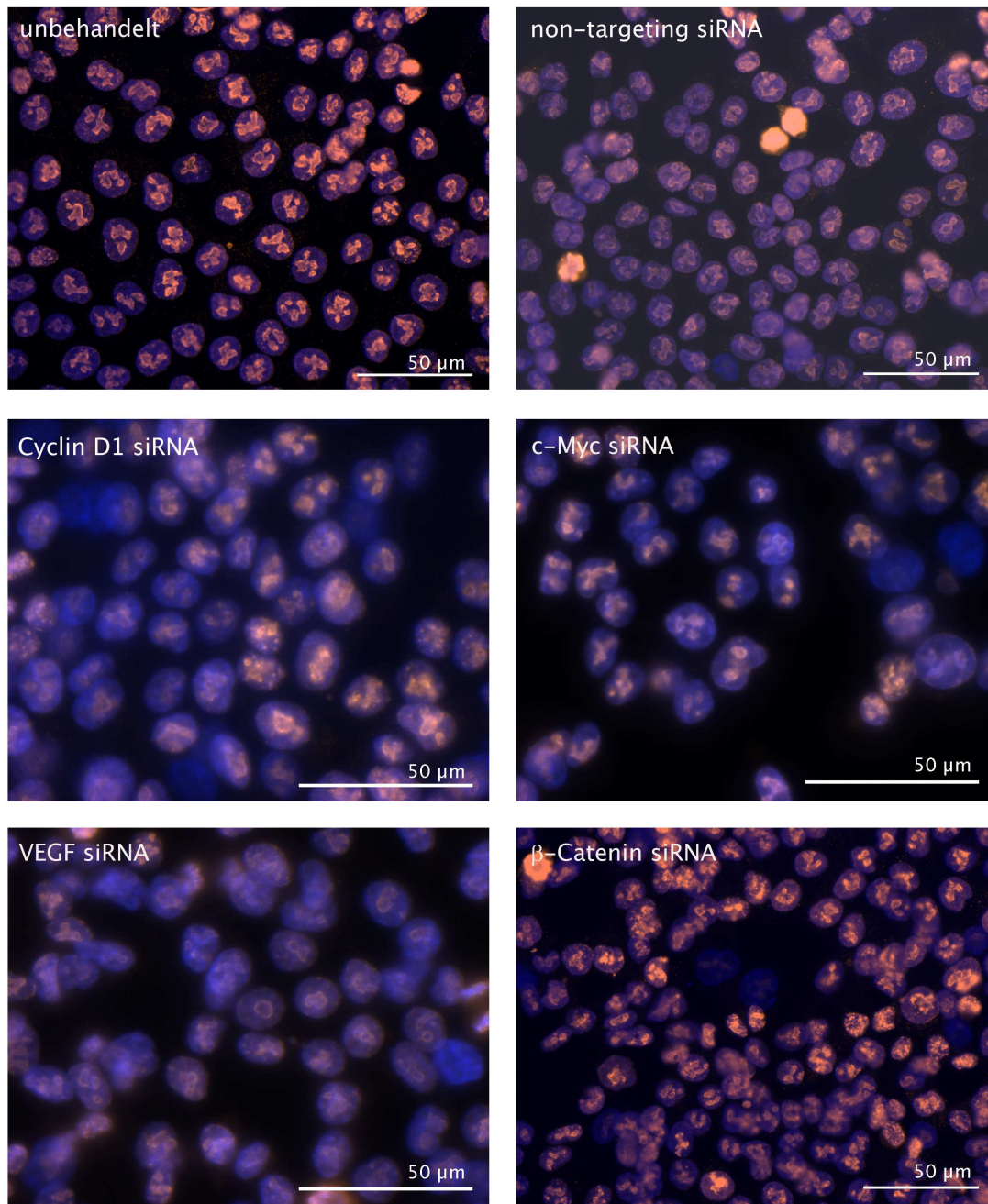
#### 4.4.2 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die aktive Zellproliferation

Veränderungen in der Zellproliferation, die durch Verwendung der betreffenden siRNA bedingt wurden, sollten außerdem mit Hilfe einer immunzytochemischen Ki-67-Markierung untersucht werden. Bei Ki-67 handelt es sich um ein nukleäres Protein, das in allen Phasen des Zellzyklus, außer der G<sub>0</sub>-Phase, synthetisiert wird. Somit ist es nur in aktiv proliferierenden Zellen zu finden und kann daher als Proliferationsmarker genutzt werden. Darüber hinaus ist es durch eine kurze Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden gekennzeichnet (Hayat, 2002). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Ki-67-Markierung in den verschiedenen Zelllinien finden sich in den Abbildungen 4.11 bis 4.13.

In Abbildung 4.11 ist zu sehen, dass sowohl in unbehandelten als auch in *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen nahezu alle Zellkerne eine Ki-67-Markierung aufwiesen. Dies ist eine typische Beobachtung für Tumorzellen in Kultur. Im Gegensatz dazu waren in Cyclin D1 siRNA und c-Myc siRNA behandelten HCT116 Zellen einige Ki-67 negative Zellen zu beobachten. Die übrigen behandelten Zellen zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle.

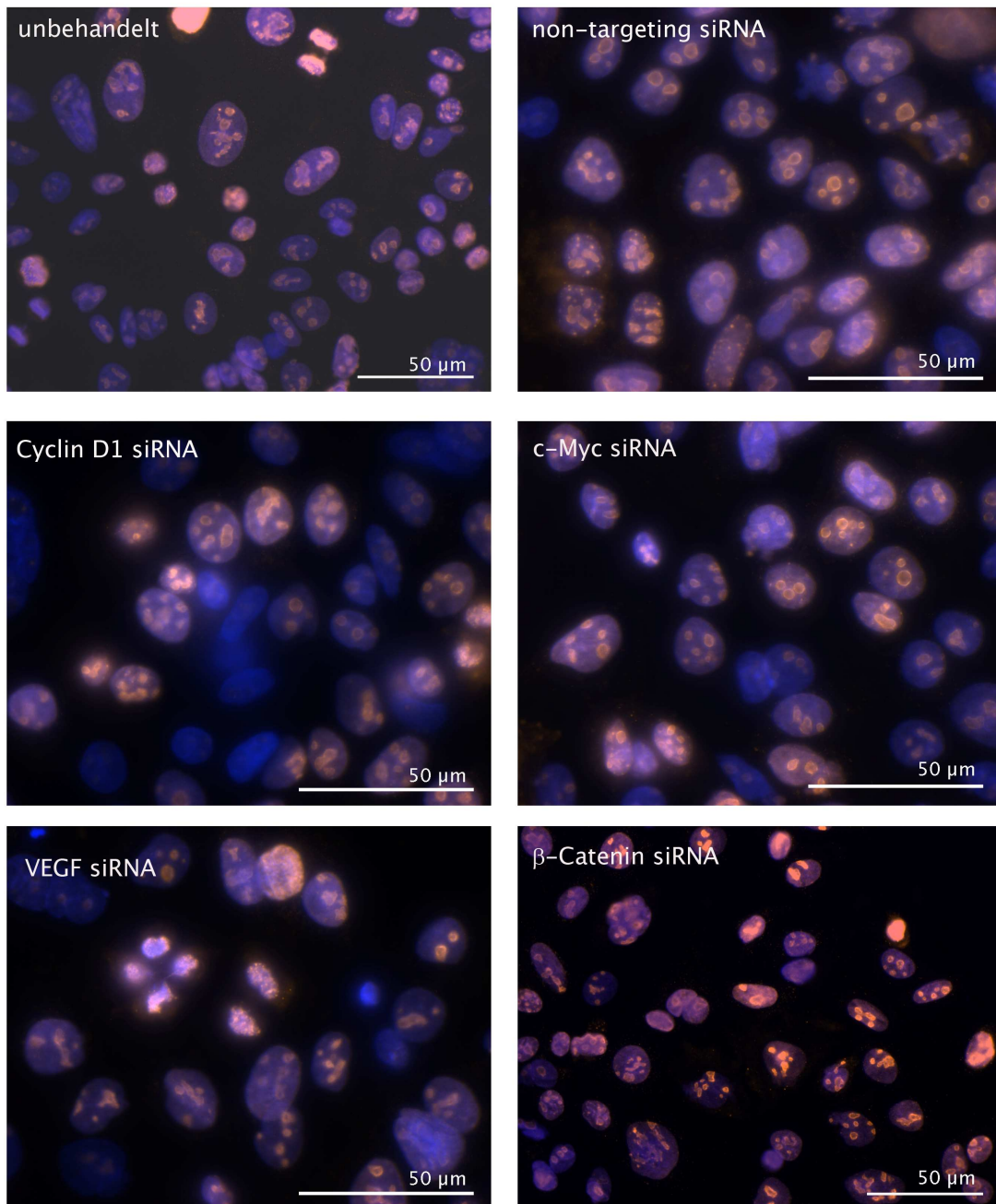
Auch in SW480 Zellen (Abbildung 4.12) zeigten fast alle Zellkerne der Kontrollzellen eine Ki-67-Markierung. In Cyclin D1 siRNA und c-Myc siRNA behandelten Zellen waren wiederum einige Ki-67 negative Zellen zu beobachten. Die übrigen behandelten Zellen zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle.

In HeLa Zellen (Abbildung 4.13) waren nicht nur in den Kontrollzellen sondern auch in den siRNA behandelten Zellen nahezu alle Zellkerne Ki-67 positiv.

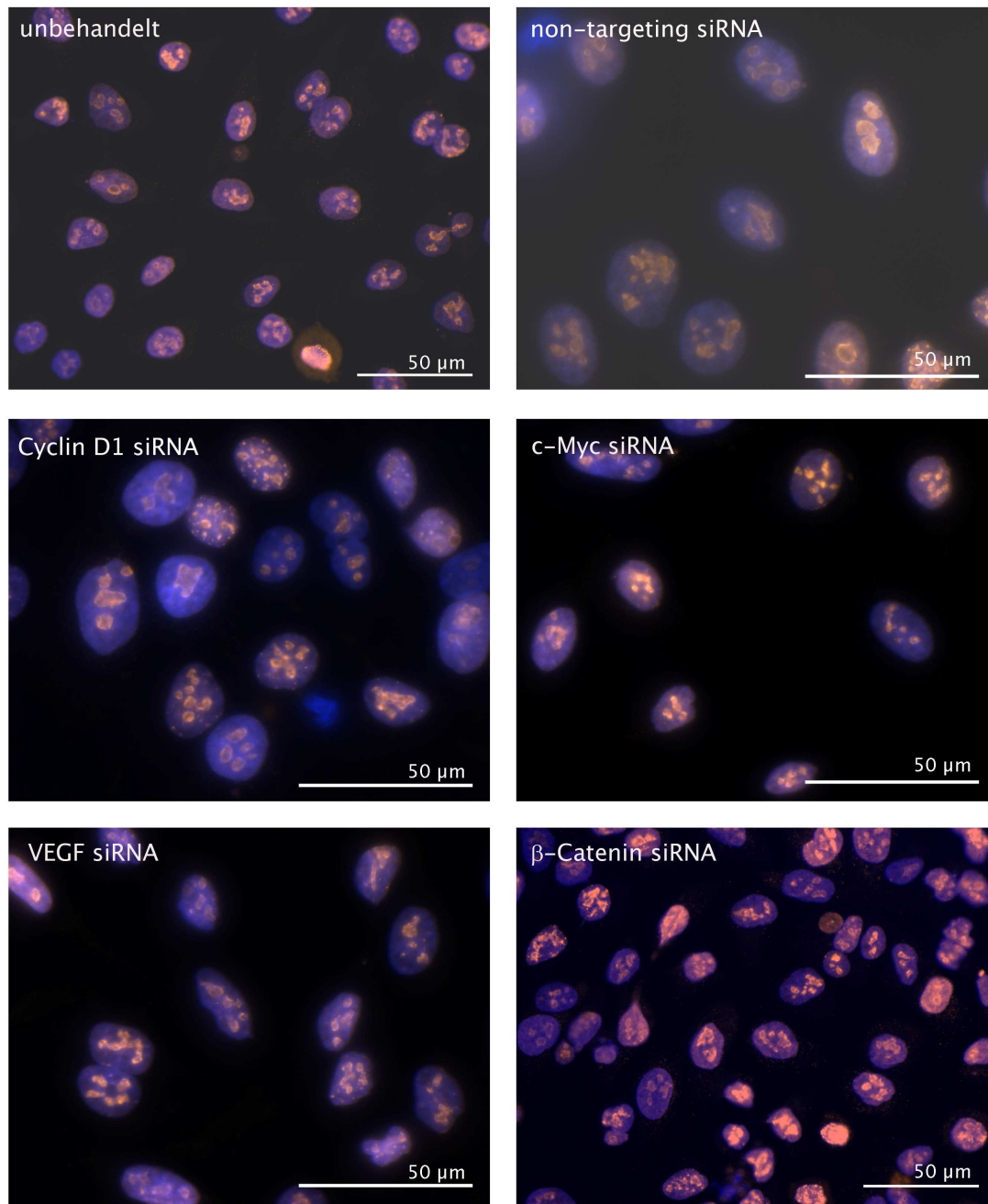


**Abb. 4.11: Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Ki-67 (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



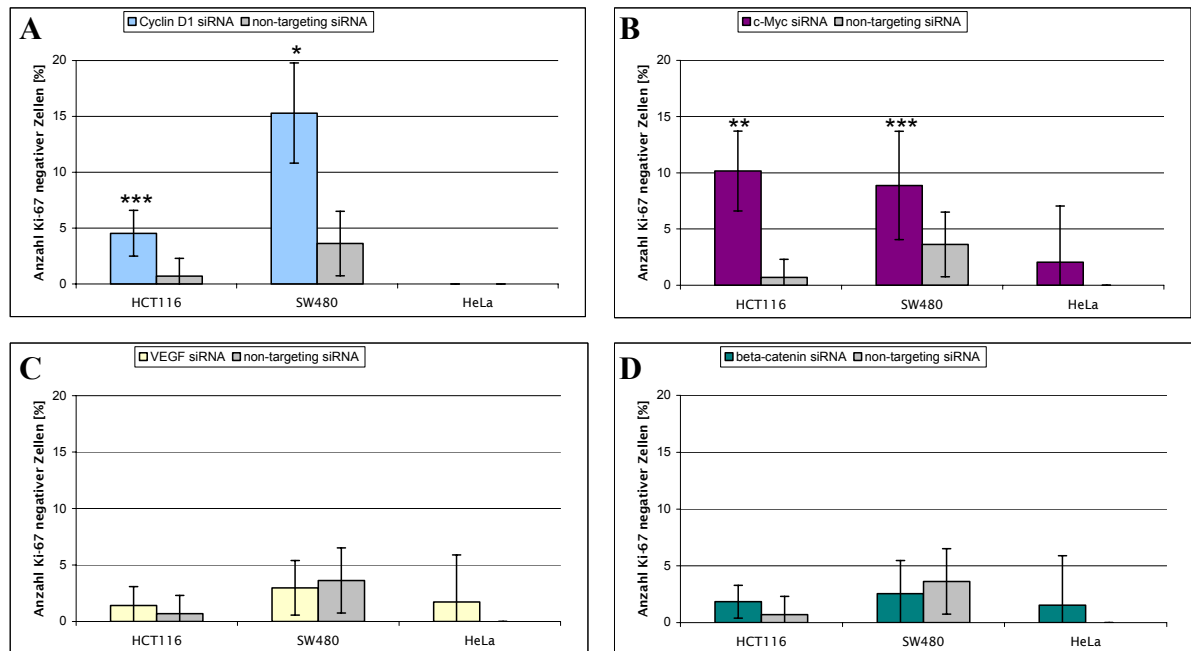


**Abb. 4.12: Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Ki-67 (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.13: Der Zellproliferationsmarker Ki-67 in siRNA behandelten HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Ki-67 (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden ausgewertet, indem die Anzahl an Ki-67 negativen Zellkernen in drei bis acht Bildausschnitten bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 und Tabelle 4.4 zusammengefasst.



**Abb. 4.14: Regulation der Zellproliferation in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Dargestellt ist der relative Anteil an Ki-67 negativen Zellkernen in siRNA behandelten Zellen in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,05$ .

**Tab. 4.4: Regulation der Zellproliferation in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist der relative Anteil an Ki-67 negativen Zellkernen in siRNA behandelten Zellen in Prozent.

	HCT116 Zellen	SW480 Zellen	HeLa Zellen
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	5 ± 2	15 ± 4	0 ± 0
<b>c-Myc siRNA</b>	10 ± 4	9 ± 5	2 ± 5
<b>VEGF siRNA</b>	1 ± 2	3 ± 2	2 ± 4
<b><math>\beta</math>-Catenin siRNA</b>	2 ± 1	3 ± 3	2 ± 4
<b>non-targeting siRNA</b>	1 ± 2	4 ± 3	0 ± 0

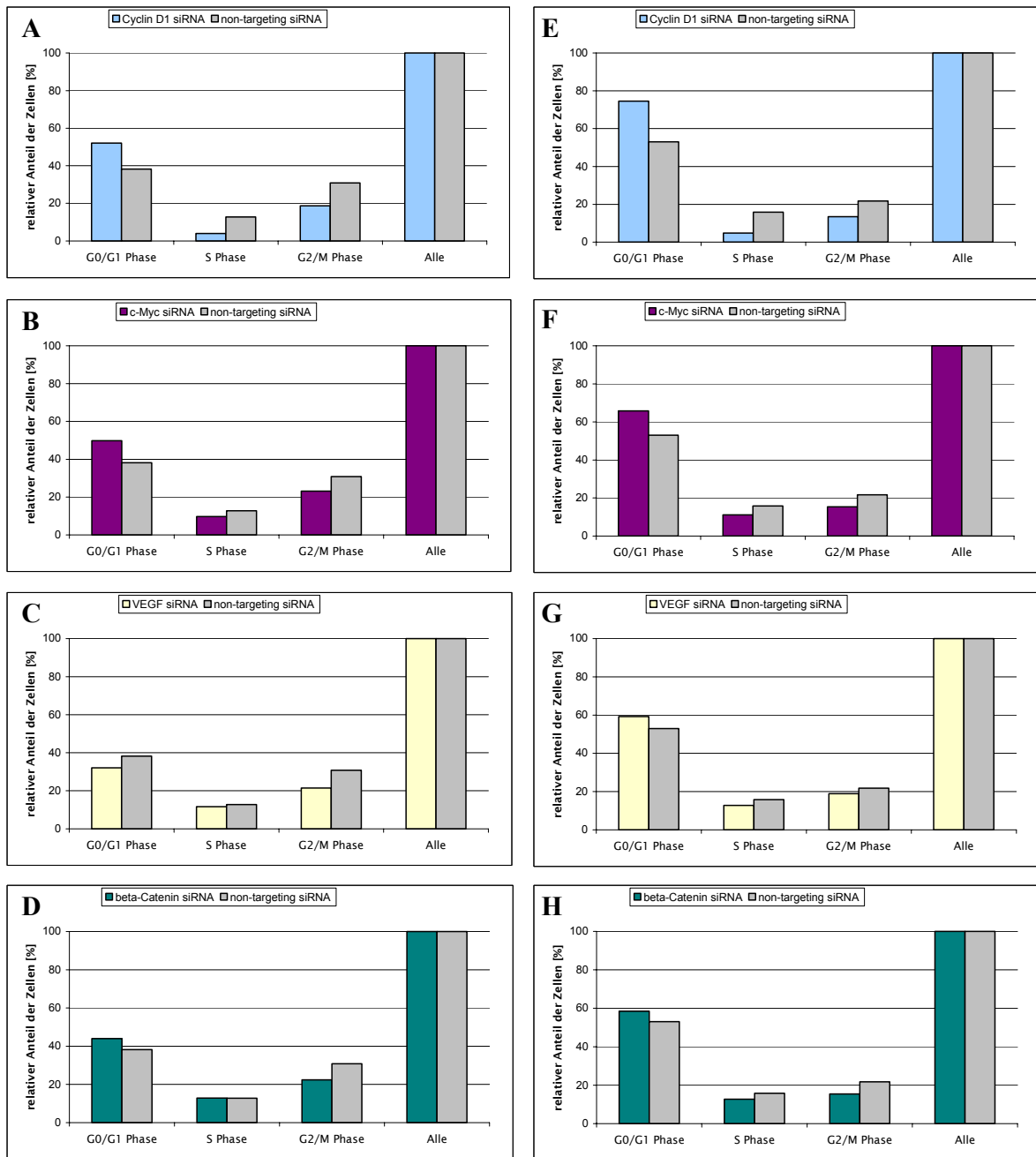
Hier ist zu sehen, dass es sich bei den oben beschriebenen Unterschieden in Cyclin D1 siRNA und c-Myc siRNA behandelten HCT116 und SW480 Zellen um signifikante Veränderungen in der Anzahl Ki-67 positiver Zellkerne handelte. Weder die Transfektion der VEGF siRNA noch der  $\beta$ -Catenin siRNA zeigte dagegen eine Veränderung. In HeLa Zellen war in keiner der siRNA behandelten Zellen ein Unterschied zu den Kontrollzellen zu beobachten.

#### **4.4.3 Die Rolle des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene in der Zellzyklusprogression**

Für eine genauere Charakterisierung der Regulation des Zellzyklus von Kolonkarzinomzellen durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene wurde der relative Anteil siRNA behandelter Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus mittels Propidiumiodidfärbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

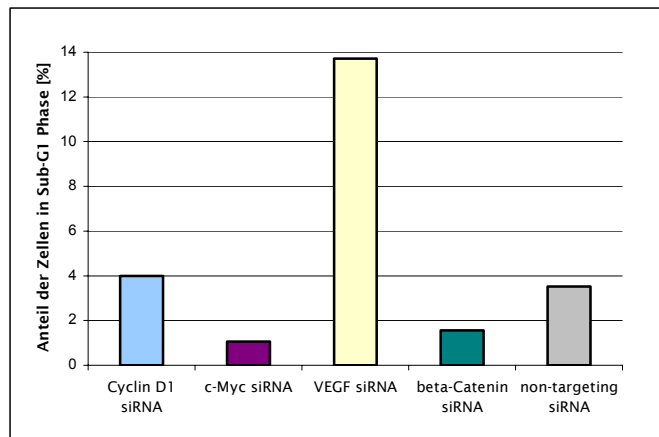
Abbildung 4.15 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse, die in Tabelle 4.5 zusammengefasst sind.

In der Abbildung ist zu sehen, dass die Behandlung mit Cyclin D1 siRNA sowohl in HCT116 als auch in SW480 Zellen zu einem erhöhten Anteil der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase führte, wohingegen sich weniger Zellen in der S- beziehungsweise G<sub>2</sub>/M-Phase befanden. Dies war ebenfalls nach Transfektion der Zellen mit c-Myc siRNA der Fall. Im Gegensatz dazu war weder nach Verwendung der VEGF siRNA noch der  $\beta$ -Catenin siRNA eine signifikante Änderung im Zellzyklus der Kolonkarzinomzellen zu erkennen.



**Abb. 4.15: Regulation des Zellzyklus in siRNA behandelten Kolonkarzinomzellen. (A-D) Analyse von siRNA behandelten HCT116 Zellen. (E-H) Analyse von siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist der relative Anteil der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- beziehungsweise G<sub>2</sub>/M-Phase in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen (grau). Die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie erfolgte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion. n = 2 beziehungsweise n = 1 (Cyclin D1 siRNA und VEGF siRNA behandelte HCT116 Zellen).

Darüber hinaus wurde der Anteil apoptotischer HCT116 Zellen bestimmt, welcher sich nach siRNA Behandlung in der Sub-G<sub>1</sub>-Phase befand. Dieser Teil der Zellpopulation ist in Abbildung 4.16 dargestellt.



**Abb. 4.16: Anteil apoptotischer Zellen in der Sub-G<sub>1</sub>-Phase in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** n = 2 (c-Myc siRNA,  $\beta$ -Catenin siRNA, *non-targeting* siRNA) beziehungsweise n = 1 (Cyclin D1 siRNA, VEGF siRNA).

Hier ist zu sehen, dass der Anteil apoptotischer HCT116 Zellen in der Sub-G<sub>1</sub>-Phase in VEGF siRNA behandelten Zellen deutlich höher war als in den *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen, während in den anderen Ansätzen keine Änderung festgestellt wurde.

**Tab. 4.5: Zellzyklusprogression in siRNA behandelten HCT116 und SW480 Zellen.** Zu sehen ist der relative Anteil (in Prozent) der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- beziehungsweise G<sub>2</sub>/M-Phase. Darüber hinaus ist für HCT116 Zellen der Anteil apoptotischer Zellen in der Sub-G<sub>1</sub>-Phase gezeigt.

	HCT116 Zellen				SW480 Zellen		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	Sub-G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	52	4	19	4	75	5	13
<b>c-Myc siRNA</b>	50	10	23	1	67	11	15
<b>VEGF siRNA</b>	32	12	21	14	59	13	19
<b><math>\beta</math>-Catenin siRNA</b>	44	13	22	2	59	13	15
<b><i>non-targeting</i> siRNA</b>	38	13	31	4	53	16	22

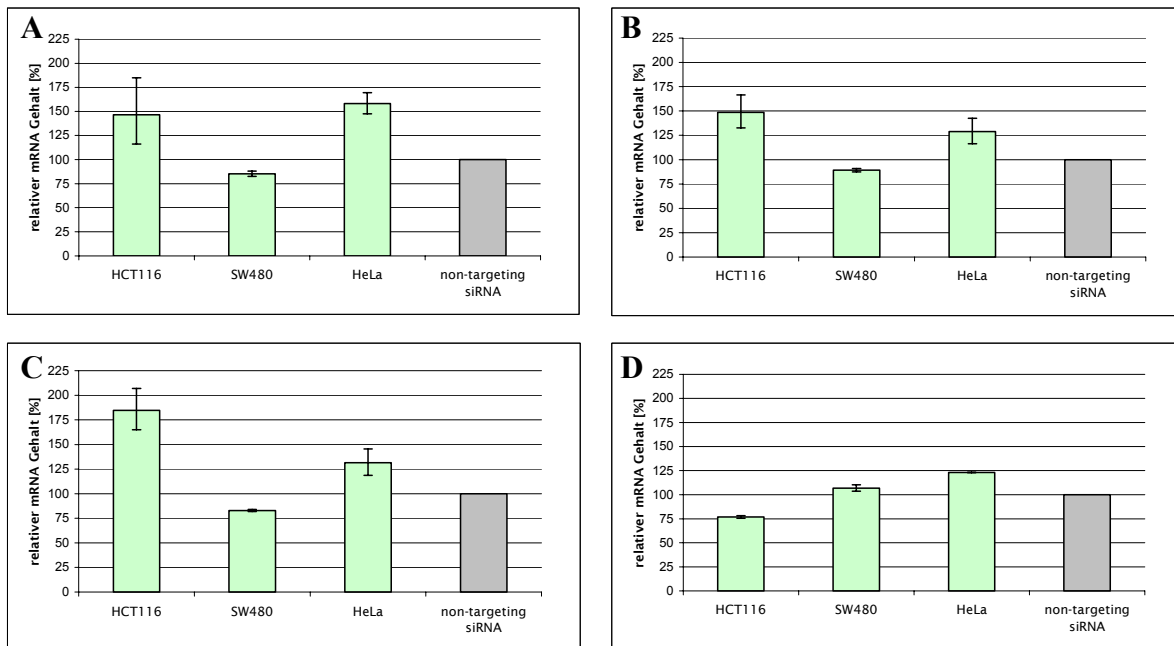
#### 4.4.4 *CDKN1A*, *TP53* und *TFRC* als Zielgene des Wnt Signalwegs

Zur näheren Charakterisierung der Rolle des Wnt Signalwegs in der Zellproliferation wurden in dieser Arbeit Gene untersucht, die auf verschiedene Weise in diesen Prozess involviert und zudem teilweise als primäre beziehungsweise sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs bekannt sind. Zu diesen zählten *CDKN1A* (kodiert p21), *TP53* (kodiert p53) und *TFRC* (kodiert den Transferrin Rezeptor).

##### 4.4.4.1 *CDKN1A* als Zielgen des Wnt Signalwegs

Bei p21 handelt es sich um einen Inhibitor des Cyclin E/CDK2 Komplexes, der in der Progression des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt. p21 begünstigt somit die Differenzierung von Zellen, indem es einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase bewirkt (van de Wetering *et al.*, 2002).

*CDKN1A* wird sowohl als direktes als auch als indirektes Wnt Zielgen diskutiert. Zum einen führt der Wnt Signalweg selbst zu einer Inhibierung des *CDKN1A* Promotors (Kamei *et al.*, 2003). Zum anderen kann dies ebenfalls durch c-Myc erfolgen (Gartel *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Staller *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005). Um einen weiteren Hinweis auf die Rolle des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob es sich in den verwendeten Zelllinien bei *CDKN1A* um ein primäres oder um ein sekundäres Zielgen handelt. Dazu wurden mit siRNA behandelte HCT116, SW480 und HeLa Zellen mittels quantitativer *real-time* RT PCR analysiert. Die Untersuchung erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Der jeweilige p21 mRNA Gehalt ist in Abbildung 4.17 zu sehen.



**Abb. 4.17:** Der p21 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative p21 mRNA Gehalt zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der p21 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Die Verwendung der Cyclin D1 siRNA hatte in HCT116 Zellen eine Erhöhung der p21 mRNA Menge zur Folge. In SW480 Zellen dagegen war ein Rückgang des p21 Gehaltes um 15% zu sehen, während in HeLa Zellen ein Anstieg um 58% des p21 Gehaltes beobachtet werden konnte. In HCT116 Zellen, die mit c-Myc siRNA behandelt worden waren, war ebenfalls eine Erhöhung des p21 Gehaltes um 49% zu erkennen. Im Gegensatz dazu war in SW480 Zellen kein Effekt zu beobachten. In HeLa Zellen war eine Erhöhung der p21 mRNA Menge um 29% zu verzeichnen. Auch bei Verwendung der VEGF mRNA war ein Effekt auf die p21 mRNA Menge in HCT116 Zellen zu sehen. Hier resultierte die VEGF Inaktivierung in einer Erhöhung von p21 um 85%. In SW480 Zellen dagegen zeigte sich ein Rückgang um 17%, während HeLa Zellen eine Erhöhung um 31% aufwiesen.

In HCT116 Zellen resultierte die  $\beta$ -Catenin Inaktivierung in einem Rückgang der p21 Menge auf mRNA Ebene um 23% während in SW480 Zellen zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied in Bezug auf den mRNA Gehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen war. Im Gegensatz dazu führte in HeLa Zellen die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA zu einem Anstieg des p21 Gehaltes um 23%.



Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.6 zu sehen.

**Tab. 4.6: Verringerung des p21 mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien.** Dargestellt ist der mRNA Gehalt in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. In diesen betrug der p21 mRNA Gehalt 100%.

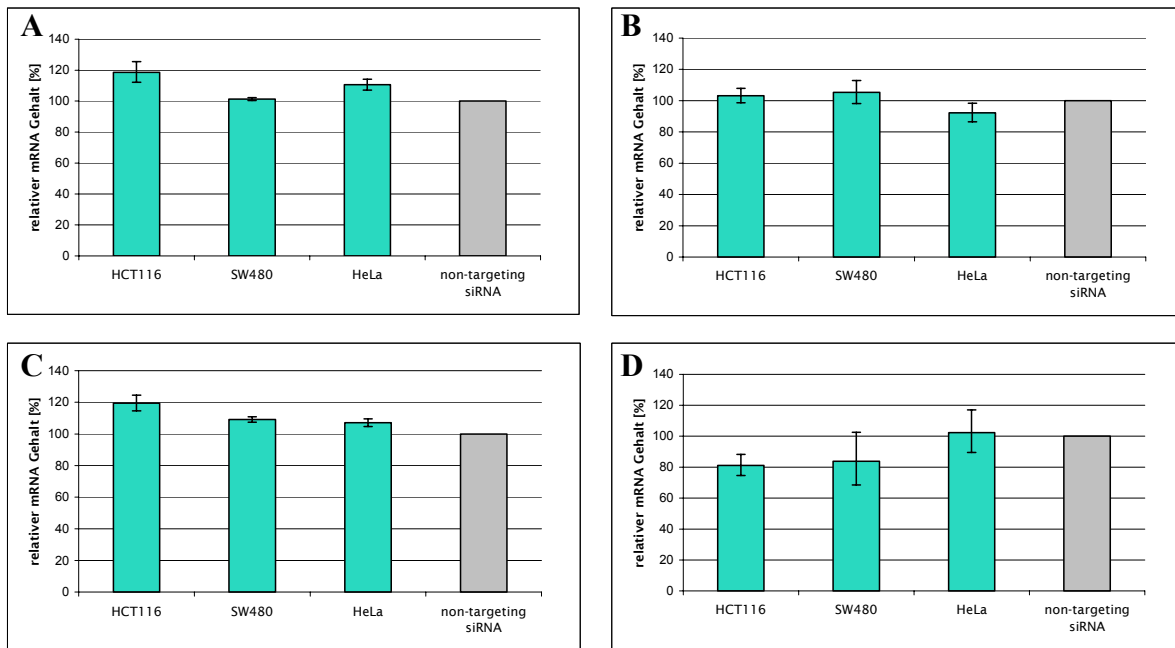
	HCT116 Zellen	SW480 Zellen	HeLa Zellen
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	146 ± 38	85 ± 3	158 ± 12
<b>c-Myc siRNA</b>	149 ± 18	89 ± 2	129 ± 14
<b>VEGF siRNA</b>	185 ± 22	83 ± 1	131 ± 14
<b>β-Catenin siRNA</b>	77 ± 1	107 ± 3	123 ± 0,5

Die Transkription von *CDKN1A* wird außerdem durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert. In der Promotorregion von *CDKN1A* finden sich zwei Kopien der p53 Erkennungssequenz, so dass die Aktivierung von p53, z.B. durch DNA Schädigung, letztlich zu einer erhöhten p21 Proteinmenge führt. Dies wiederum hat den Stopp des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase zur Folge. Aus diesem Grund wurde die Regulation des Tumorsuppressorgens *TP53* durch den Wnt Signalweg und seiner Zielgene mittels quantitativer *real-time* RT PCR untersucht.

#### 4.4.4.2 *TP53* als Zielgen des Wnt Signalwegs

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Funktionen vermittelt, indem er eine große Anzahl an Zielgenen aktiviert oder reprimiert (Zhao *et al.*, 2000; Vogelstein *et al.*, 2000; Mirza *et al.*, 2003; Polyak *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist *TP53* eines der häufigsten mutierten Gene in humanen Tumoren (Levine *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991).

Für die Bestimmung von *TP53* als primäres beziehungsweise sekundäres Zielgen des Wnt Signalwegs wurden HCT116, SW480 und HeLa Zellen mit der jeweiligen siRNA behandelt und anschließend mit Hilfe von quantitativer *real-time* RT PCR analysiert. Die Untersuchung erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Der entsprechende p53 mRNA Gehalt ist in Abbildung 4.18 zu sehen.



**Abb. 4.18:** Der p53 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative p53 mRNA Gehalt zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der p53 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Die Transfektion von Cyclin D1 siRNA führte in HCT116 Zellen zu einer Erhöhung des p53 mRNA Gehaltes um etwa 20%, wohingegen in den beiden anderen untersuchten Zelllinien keine Änderung zu sehen war. Auch die Verwendung der c-Myc siRNA zeigte in keiner der Tumorzelllinien eine signifikante Änderung der p53 mRNA Menge. Nach VEGF siRNA Behandlung war lediglich in HCT116 Zellen eine Erhöhung des p53 mRNA Gehaltes um 19% zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung der HCT116 Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA eine Verringerung der p53 mRNA Menge um 19%. Sowohl in SW480 als auch in HeLa Zellen konnte erneut keine signifikante Änderung festgestellt werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.7 dargestellt.

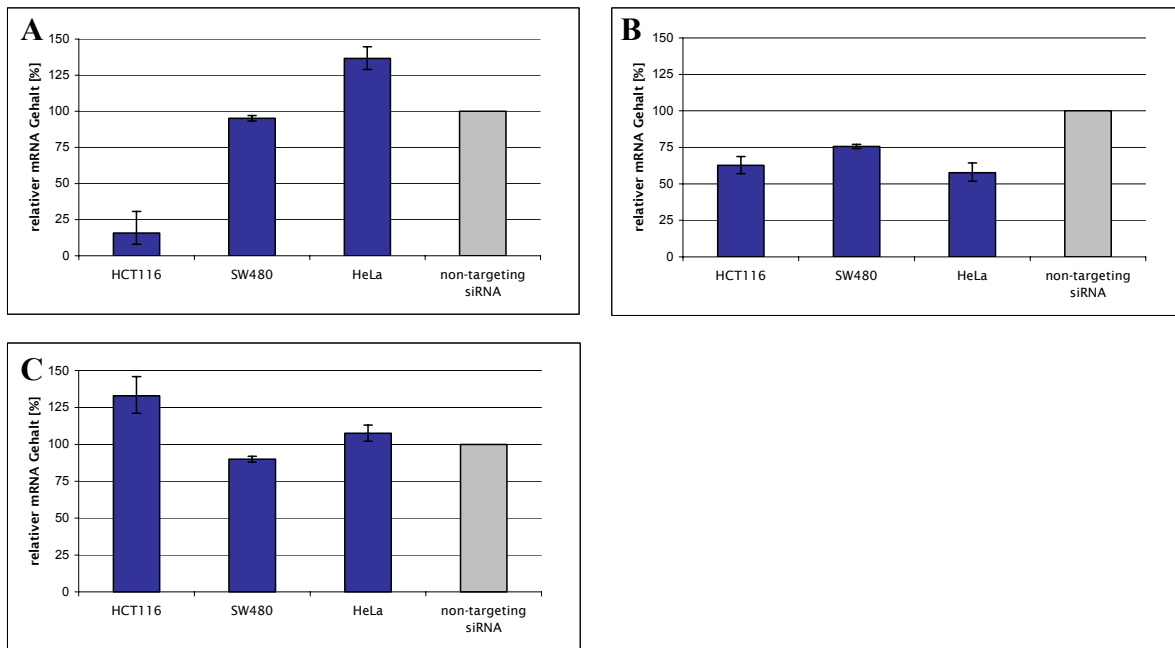
**Tab. 4.7: Veränderung des p53 mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien.** Dargestellt ist der jeweilige mRNA Gehalt in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. In diesen betrug der p53 mRNA Gehalt 100%.

	HCT116 Zellen	SW480 Zellen	HeLa Zellen
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	119 ± 7	101 ± 1	111 ± 4
<b>c-Myc siRNA</b>	103 ± 5	105 ± 8	92 ± 6
<b>VEGF siRNA</b>	119 ± 5	109 ± 2	107 ± 2
<b>β-Catenin siRNA</b>	81 ± 7	84 ± 19	102 ± 15

#### 4.4.4.3 *TFRC* als Zielgen des Wnt Signalwegs

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der ausgewählten Wnt Zielgene auf die Zellproliferation wurde zuletzt der mRNA Gehalt eines bekannten c-Myc Zielgens, des Transferrin Rezeptors, in siRNA behandelten Zellen untersucht. Die Menge der TfR Moleküle auf der Zelloberfläche korreliert mit der Proliferationsrate einer Zelle und in Krebszellen wird häufig eine erhöhte *TFRC*-Expression detektiert (Gatter *et al.*, 1983; Richardson, 2002; Daniels *et al.*, 2006). Die Untersuchung erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT PCR und ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.8 zu sehen.

In Cyclin D1 siRNA behandelten HCT116 Zellen war ein Rückgang des Transferrin Rezeptor mRNA Gehaltes um 84% zu erkennen, während in SW480 Zellen kein Effekt zu verzeichnen war. HeLa Zellen dagegen zeigten eine Hochregulation von TfR um 37%. Im Gegensatz dazu konnte in c-Myc siRNA behandelten Zellen in jeder Zelllinie eine Senkung um mindestens 24% beobachtet werden. VEGF siRNA transfizierte HCT116 Zellen zeigten eine Hochregulation des TfR mRNA Gehaltes um 33%. In den anderen untersuchten Zelllinien war kein Effekt zu erkennen.



**Abb. 4.19:** Der Transferrin Rezeptor mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung und (C) nach VEGF siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative Transferrin Rezeptor mRNA Gehalt zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der Transferrin Rezeptor mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3.

**Tab. 4.8:** Verringerung des Transferrin Rezeptor mRNA Gehaltes nach Transfektion der betreffenden siRNA in den verschiedenen Zelllinien. Dargestellt ist der jeweilige mRNA Gehalt in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. In diesen betrug der Transferrin Rezeptor mRNA Gehalt 100%.

	HCT116 Zellen	SW480 Zellen	HeLa Zellen
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	16 ± 15	95 ± 2	137 ± 8
<b>c-Myc siRNA</b>	63 ± 6	76 ± 1	58 ± 7
<b>VEGF siRNA</b>	133 ± 13	90 ± 2	107 ± 6

#### 4.4.5 Zusammenfassung der Regulation der Zellproliferation

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. In der ersten Tabelle (Tabelle 4.9) ist der Einfluss der jeweiligen siRNA auf die DNA Synthese und die Zellzyklusprogression dargestellt. Die zweite Tabelle (Tabelle 4.10) zeigt die Regulation von Genen durch den Wnt Signalweg, die in die Zellproliferation involviert sind.

**Tab. 4.9: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf Parameter der Proliferation von Tumorzellen.** Zu sehen sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. — bezeichnet einen Rückgang. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen. n.a.: nicht analysiert.

		DNA Syntheserate	G0/G1 Übergang	Zellzyklus- progression
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	—	—
	SW480 Zellen	—	—	—
	HeLa Zellen	—	○	n.a.
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	—	—
	SW480 Zellen	○	—	—
	HeLa Zellen	—	○	n.a.
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○
	HeLa Zellen	—	○	n.a.
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○
	HeLa Zellen	—	○	n.a.

**Tab. 4.10: Untersuchung von *CDKN1A*, *TP53* und *TFRC* als primäre und sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs in Tumorzellen.** Zu sehen ist die Regulation der Gene durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene. — bezeichnet einen Rückgang, während + eine Erhöhung anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen. n.a.: nicht analysiert.

		<i>CDKN1A</i>	<i>TP53</i>	<i>TFRC</i>
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	+	—
	SW480 Zellen	—	○	○
	HeLa Zellen	+	○	+
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	○	—
	SW480 Zellen	○	○	—
	HeLa Zellen	+	○	—
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	+	+
	SW480 Zellen	—	○	○
	HeLa Zellen	+	○	○
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	—	n.a.
	SW480 Zellen	○	○	n.a.
	HeLa Zellen	+	○	n.a.

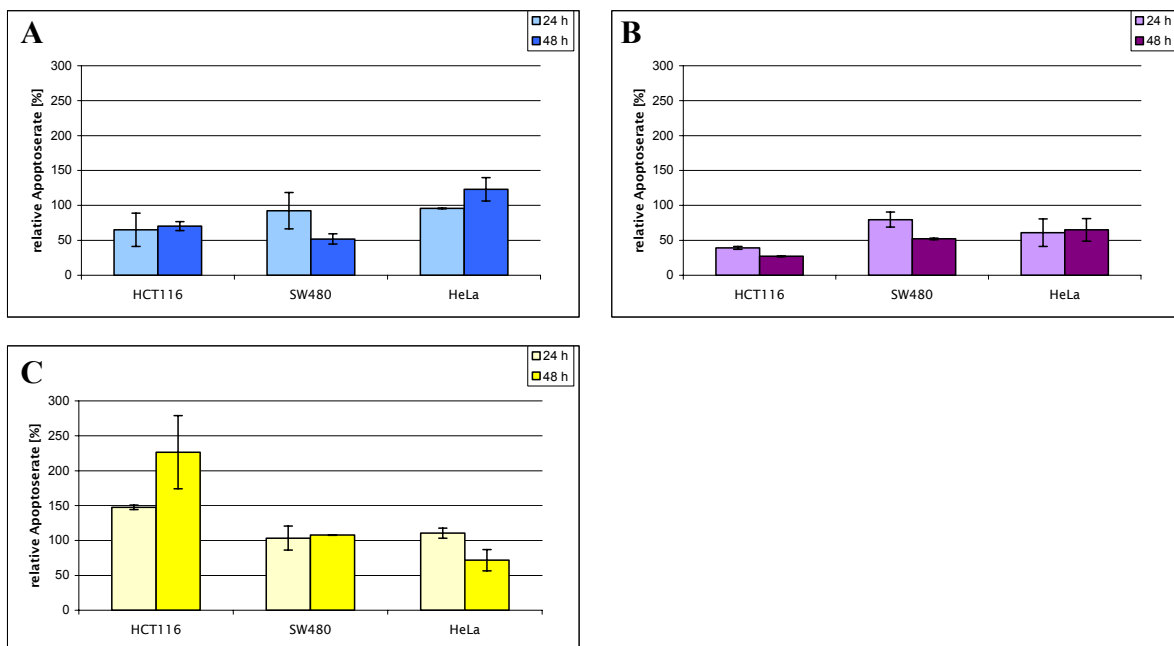
## 4.5 Einfluss der Wnt Zielgene auf die Apoptose

Weiterhin sollte der Einfluss der ausgewählten Zielgene auf die Lebensfähigkeit in HCT116, SW480 und HeLa Zellen untersucht werden. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde nach Transfektion mit siRNA ein Caspase-3/7 Assay durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mit Hilfe eines MTT Assays bestimmt. Anschließend wurde der Anteil nekrotischer Zellen durch Färbung mit Trypanblau ermittelt.

### 4.5.1 Apoptoserate in siRNA behandelten Zellen

Der Einfluss der ausgewählten Wnt Zielgene auf die Apoptoserate in siRNA behandelten Tumorzelllinien wurde mit Hilfe eines Assays (Caspase-3/7 Assay) untersucht, welcher die Aktivität der Caspasen 3 und 7, zwei in die Apoptose involvierter Proteasen, bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 zu sehen.



**Abb. 4.20: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Apoptoserate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung und (C) nach VEGF siRNA Behandlung.** Zu sehen ist die relative Apoptoserate zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der betreffenden siRNA. Die Apoptoserate in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 8.

Die Transfektion mit Cyclin D1 siRNA hatte in HCT116 Zellen einen Rückgang der Apoptoserate zur Folge, während dies in SW480 erst 48 Stunden nach Transfektion der Fall war. In HeLa Zellen ließ sich dagegen kein Effekt beobachten.

Die Verwendung der c-Myc siRNA hatte in HCT116 Zellen eine Verringerung der Apoptoserate um 61% zur Folge, die nach 48 Stunden weiter abnahm auf 27% (Senkung um 73%). Mit c-Myc siRNA behandelte SW480 Zellen zeigten erneut erst zum späteren Zeitpunkt von 48 Stunden einen Rückgang. In HeLa Zellen war ebenfalls ein Rückgang der Apoptoserate nach c-Myc siRNA Transfektion zu verzeichnen.

Mit VEGF siRNA behandelte HCT116 Zellen wiesen eine Erhöhung der Apoptoserate um bis zu 127% auf, während in SW480 Zellen kein Effekt beobachtet werden konnte. In HeLa Zellen zeigte sich nach VEGF siRNA Transfektion zum Zeitpunkt 48 Stunden ein Rückgang der Apoptoserate. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

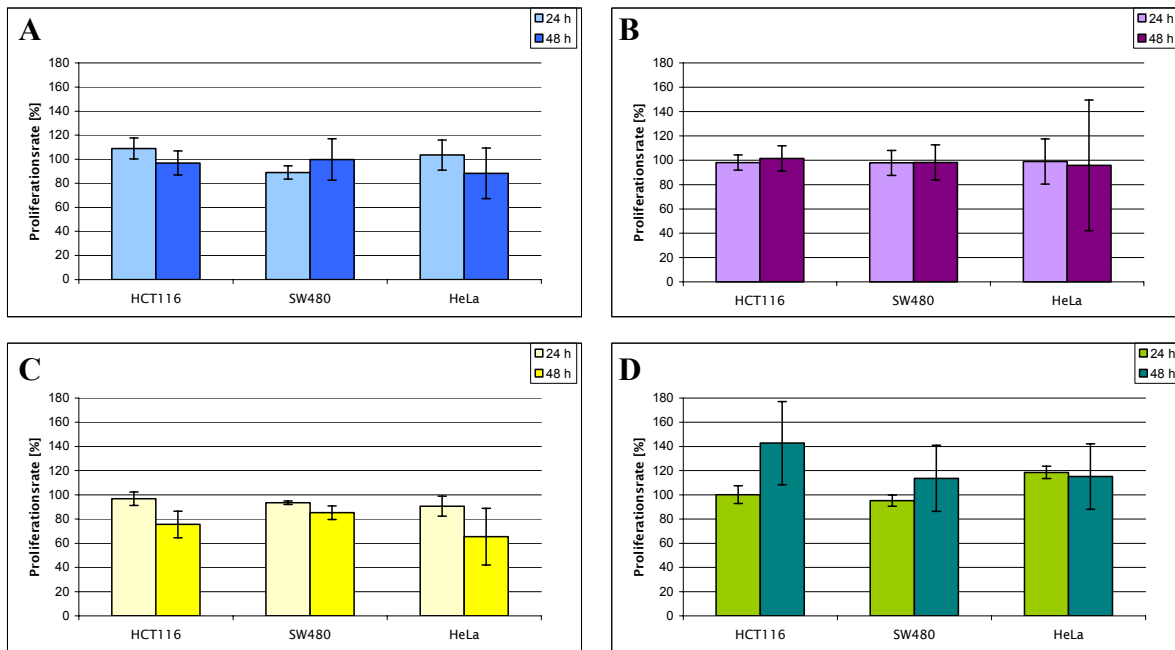
**Tab. 4.11: Apoptose in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist die relative Apoptoserate in siRNA behandelten Zellen in Prozent. Zur Bestimmung der Apoptose dienten *non-targeting* siRNA behandelte Kontrollzellen als Vergleich. Dort betrug die relative Apoptoserate 100%.

	HCT116 Zellen		SW480 Zellen		HeLa Zellen	
	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	65 ± 24	70 ± 6	92 ± 26	52 ± 7	96 ± 0,5	123 ± 17
<b>c-Myc siRNA</b>	39 ± 2	27 ± 1	80 ± 11	52 ± 1	61 ± 20	65 ± 16
<b>VEGF siRNA</b>	148 ± 3	227 ± 52	104 ± 17	108 ± 0,5	111 ± 7	72 ± 15

#### 4.5.2 Lebensfähigkeit in siRNA behandelten Zellen

Die Lebensfähigkeit der mit siRNA behandelten Zellen wurde mit Hilfe eines MTT Assays bestimmt. Abbildung 4.21 zeigt die Ergebnisse.

Weder in Cyclin D1 siRNA noch in c-Myc siRNA behandelten Zellen war ein Unterschied in der Lebensfähigkeit im Vergleich zu *non-targeting* siRNA transfizierten Zellen zu sehen. Lediglich die Behandlung mit VEGF siRNA zeigte einen leichten Rückgang der Zellzahl in HCT116 und HeLa Zellen nach 48 Stunden. Die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA hatte in keiner der verwendeten Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit.



**Abb. 4.21: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Lebensfähigkeit in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Zu sehen ist die relative Lebensfähigkeit zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der betreffenden siRNA. Die Lebensfähigkeit in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 16 (Ausnahmen: HeLa zum Zeitpunkt 24 Stunden: n = 8;  $\beta$ -Catenin siRNA behandelte Zellen: n = 5).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des MTT Assays ist in Tabelle 4.12 gezeigt.

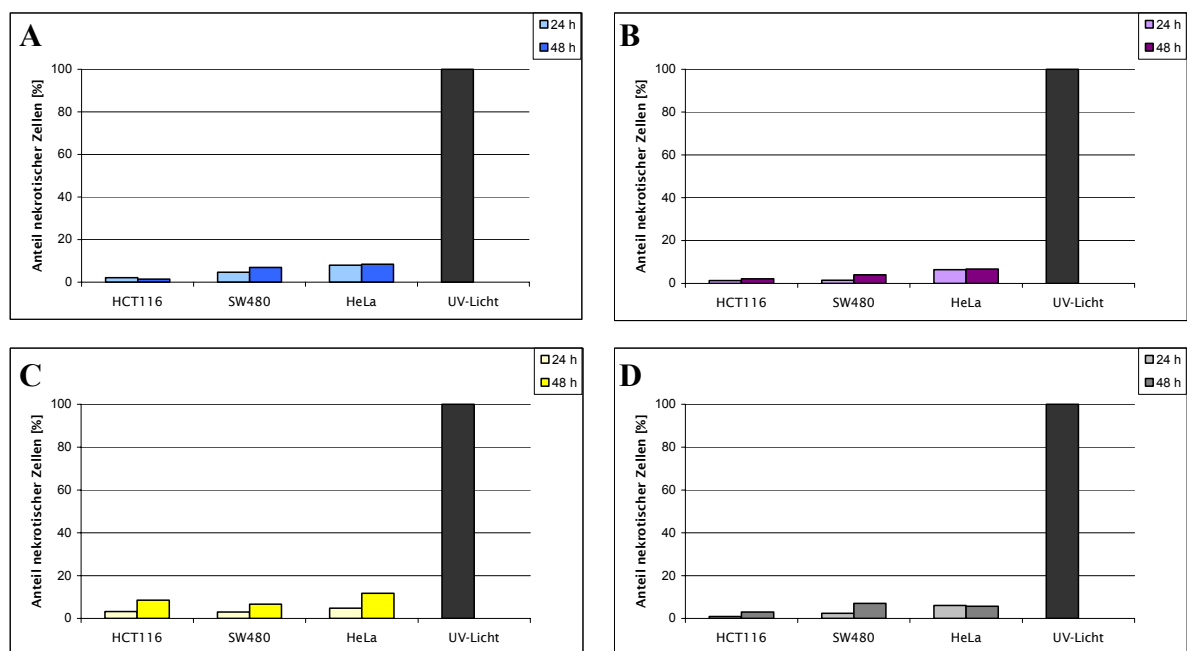
**Tab. 4.12: Lebensfähigkeit in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist die Lebensfähigkeit von siRNA behandelten Zellen in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen. In diesen betrug die Lebensfähigkeit 100%.

	HCT116 Zellen		SW480 Zellen		HeLa Zellen	
	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	109 ± 9	97 ± 10	89 ± 5	100 ± 17	103 ± 12	88 ± 21
<b>c-Myc siRNA</b>	98 ± 6	102 ± 10	98 ± 10	98 ± 14	99 ± 19	96 ± 54
<b>VEGF siRNA</b>	97 ± 5	76 ± 11	93 ± 1	85 ± 6	91 ± 8	65 ± 23
<b><math>\beta</math>-Catenin siRNA</b>	100 ± 7	143 ± 34	95 ± 5	114 ± 27	119 ± 5	115 ± 27



### 4.5.3 Nekrose in siRNA behandelten Zellen

Um zu bestimmen, ob die siRNA Behandlung zu nekrotischem Absterben der Zellen führt, wurde die Nekrose der Zellen mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau untersucht. Trypanblau besitzt die Fähigkeit nekrotische Zellen, deren Membran durchlässig ist, zu färben. Apoptotische Zellen dagegen werden nicht angefärbt, so dass eine deutliche Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose möglich ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 zu sehen. Als Positivkontrolle wurden mit UV-Licht behandelte Zellen verwendet.



**Abb. 4.22: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Nekrose in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) in Cyclin D1 siRNA behandelten Zellen, (B) in c-Myc siRNA behandelten Zellen, (C) in VEGF siRNA behandelten Zellen und (D) in *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen.** Zu sehen ist der Anteil nekrotischer Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Behandlung der Zellen mit der betreffenden siRNA. Der Anteil nekrotischer Zellen nach vier Stunden UV-Bestrahlung betrug 100%. n = 4 (HCT116 und SW480 Zellen), n = 8 (HeLa Zellen).

Die Trypanblaufärbung zeigte einen niedrigen Anteil nekrotischer Zellen in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen. Darüber hinaus war kein Unterschied zu den *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen zu beobachten. Die Ergebnisse der Nekroseuntersuchungen sind in Tabelle 4.13 zusammengefasst.

**Tab. 4.13: Nekrose in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist der Anteil nekrotischer Zellen in siRNA behandelten Zellen in Prozent. Als Vergleich dienten mit UV-Licht bestrahlte Zellen, in denen der Anteil nekrotischer Zellen 100% betrug.

	HCT116 Zellen		SW480 Zellen		HeLa Zellen	
	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	2	1	5	7	8	8
<b>c-Myc siRNA</b>	1	2	1	4	6	7
<b>VEGF siRNA</b>	3	9	3	7	5	12
<b>non-targeting siRNA</b>	1	3	2	7	6	6

#### 4.5.4 Zusammenfassung des Einflusses auf die Apoptose

Eine Zusammenfassung der Untersuchungen zur Lebensfähigkeit siRNA behandelte Tumorzellen ist in Tabelle 4.14 dargestellt.

**Tab. 4.14: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.** Zu sehen sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. — bezeichnet einen Rückgang, während + eine Erhöhung anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen beziehungsweise mit UV-Licht bestrahlte Zellen zur Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen. n.a.: nicht analysiert.

		Apoptose	Anteil apoptotischer Zellen	Anteil nekrotischer Zellen	Lebensfähigkeit
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	○	○	○
	SW480 Zellen	—	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	○	○	○
	SW480 Zellen	—	○	○	○
	HeLa Zellen	—	n.a.	○	○
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	+	○	—
	SW480 Zellen	○	○	○	○
	HeLa Zellen	—	n.a.	○	—
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	n.a.	○	n.a.	○
	SW480 Zellen	n.a.	○	n.a.	○
	HeLa Zellen	n.a.	n.a.	n.a.	○

## **4.6 Regulation der Mitochondrienaktivität und des Stoffwechsels durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene**

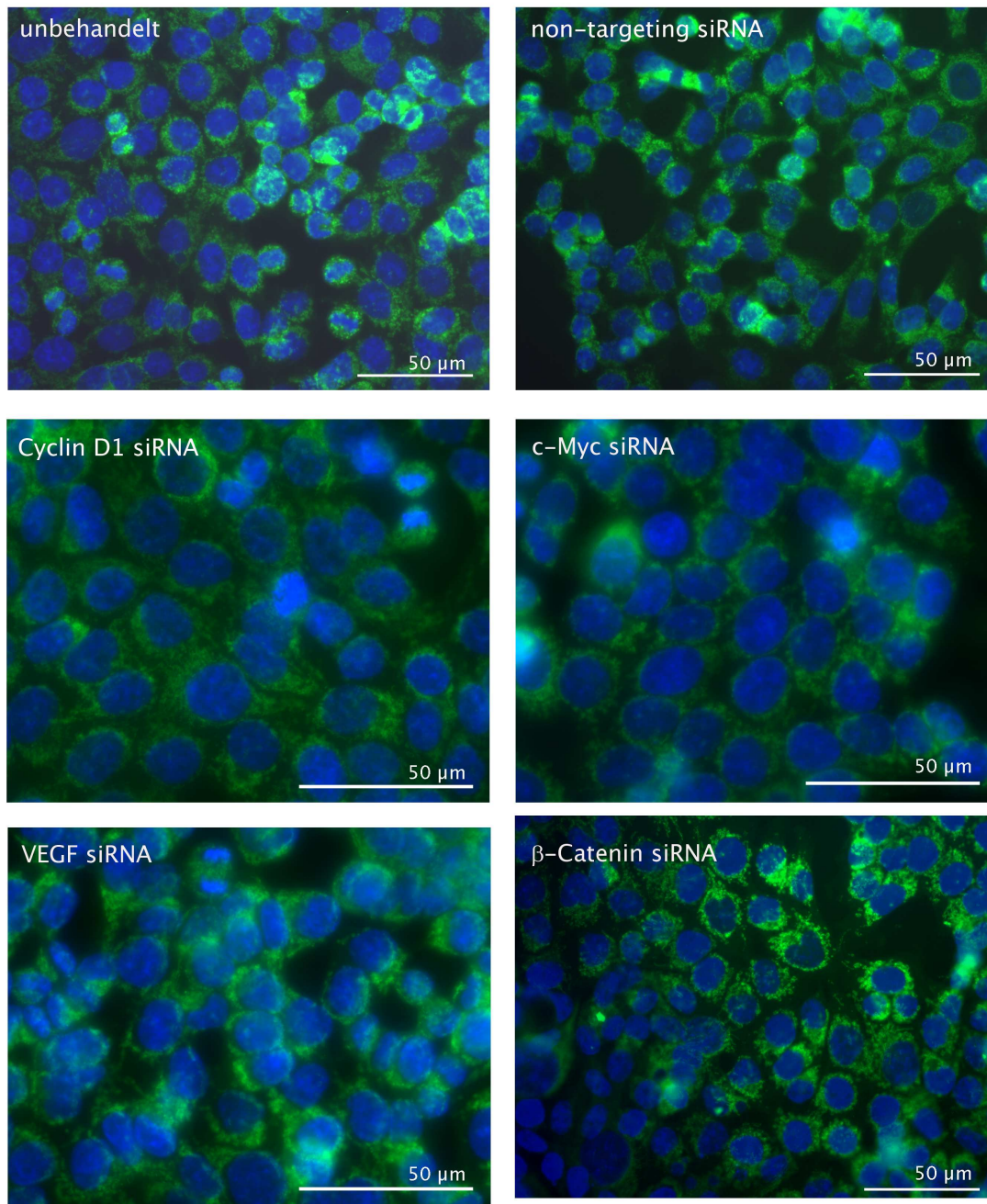
Eine weitere charakteristische Veränderung im Verlauf der Karzinogenese ist ein veränderter Energiemetabolismus (Alirol & Martinou, 2006). Im Gegensatz zu normalen Zellen weisen Krebszellen eine erhöhte Glykolyserate auf und gewinnen ihre Energie auch in Gegenwart von Sauerstoff. Hierbei wird als Entsorgungsprodukt von Pyruvat Laktat hergestellt. Dieser Effekt wird aerobe Glykolyse genannt und wurde erstmals 1956 von Otto Warburg beschrieben (Warburg, 1956a). Darüber hinaus hat die Art und Weise der Energiegewinnung einer Zelle einen Einfluss auf die Morphologie und Aktivität der Mitochondrien (Alirol & Martinou, 2006). Um festzustellen, ob der Wnt Signalweg selbst sowie die ausgewählten Zielgene Cyclin D1, c-Myc und VEGF einen Einfluss auf den Energiemetabolismus von Tumorzellen haben, sollte als nächstes die Ausdehnung des Mitochondriennetzwerkes sowie die Aktivität der Zellorganellen in siRNA behandelten Zellen analysiert werden. Anschließend erfolgte eine Untersuchung von Genen, die in der Energiegewinnung eine Rolle spielen.

### **4.6.1 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Mitochondrienmasse**

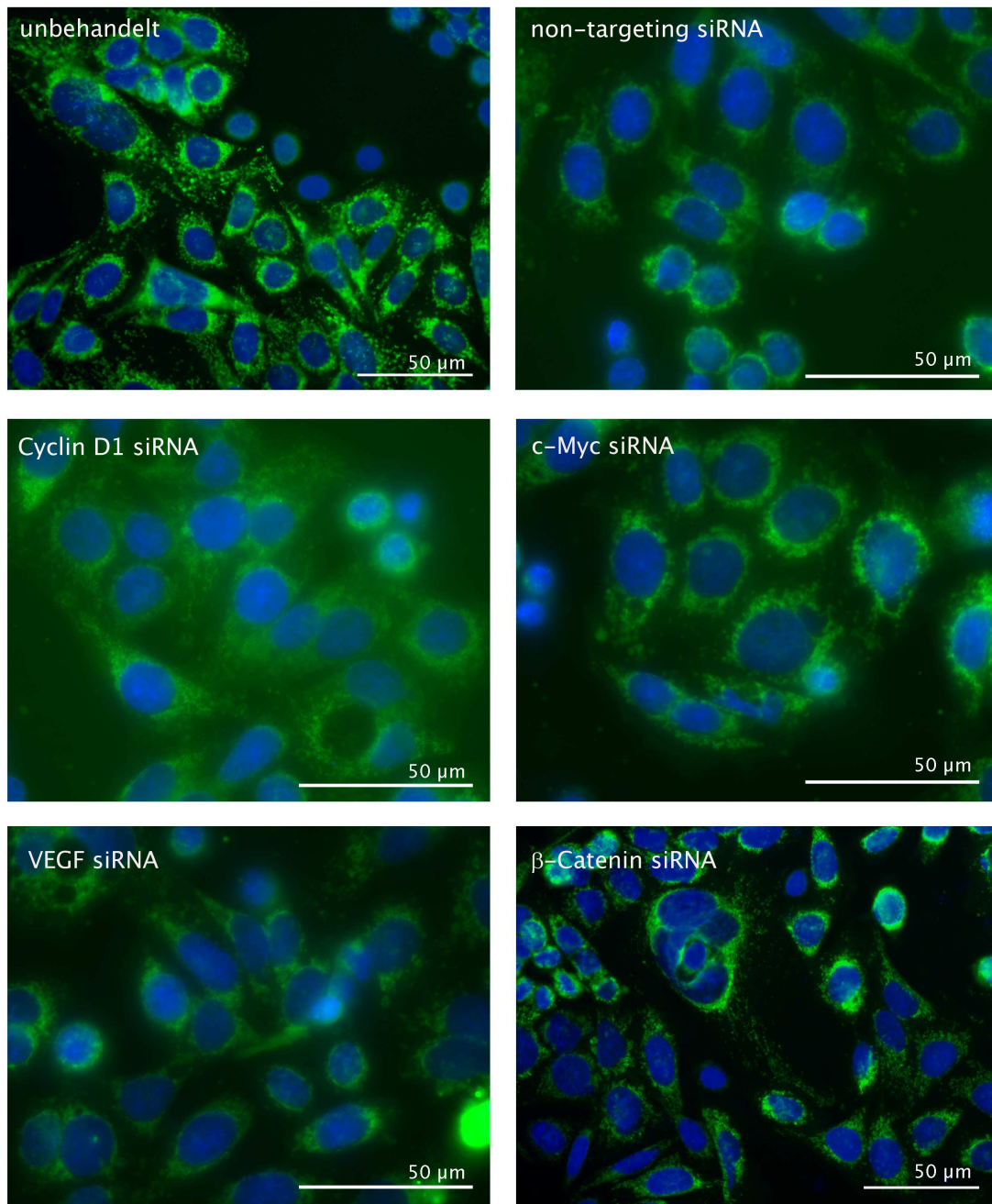
Die Mitochondrienverteilung wurde mit Hilfe des Farbstoffes MitoTracker<sup>®</sup> Green FM, welcher spezifisch in die Mitochondrienmembran eingelagert wird, analysiert. Zunächst wurde die Mitochondrienmasse in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in siRNA behandelten Zellen charakterisiert. Anschließend erfolgte eine nähere Bestimmung mittels Durchflusszytometrie.

#### **4.6.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen MitoTracker<sup>®</sup> Green FM markierter Zellen**

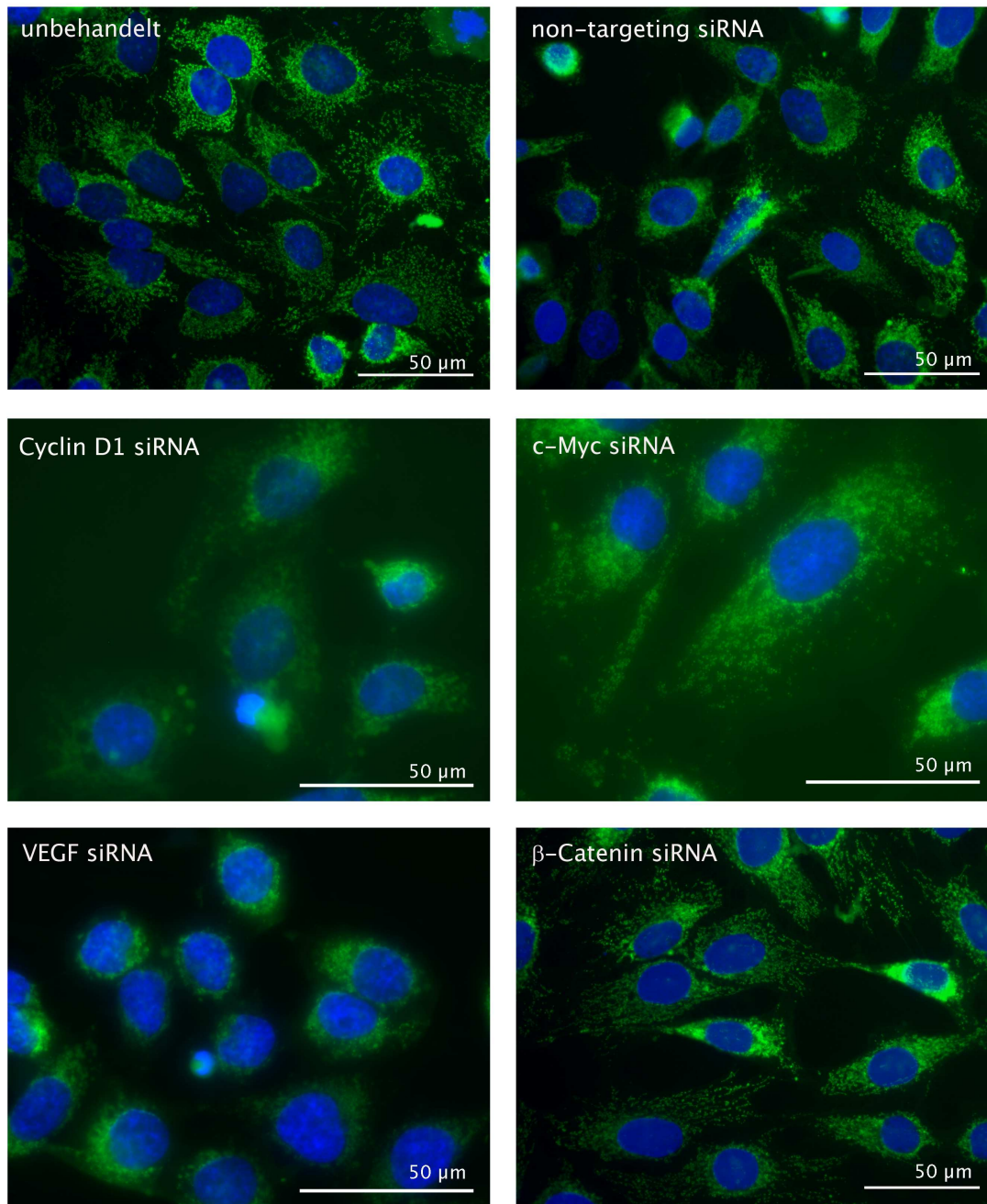
Die Bestimmung der Mitochondrienmasse in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist in den Abbildungen 4.23 bis 4.25 zu sehen.



**Abb. 4.23: Mitochondrien in HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.24: Mitochondrien in SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von MitoTracker® Green FM (grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.25: Mitochondrien in HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.

In HCT116 Zellen (Abbildung 4.23) lag in Cyclin D1 siRNA behandelten Zellen eine stärkere MitoTracker Green FM-Markierung vor als in Kontrollzellen. Dies konnte ebenfalls in β-Catenin siRNA behandelte Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu schien in c-

Myc siRNA und VEGF siRNA transfizierten Zellen die Mitochondrienmarkierung schwächer zu sein.

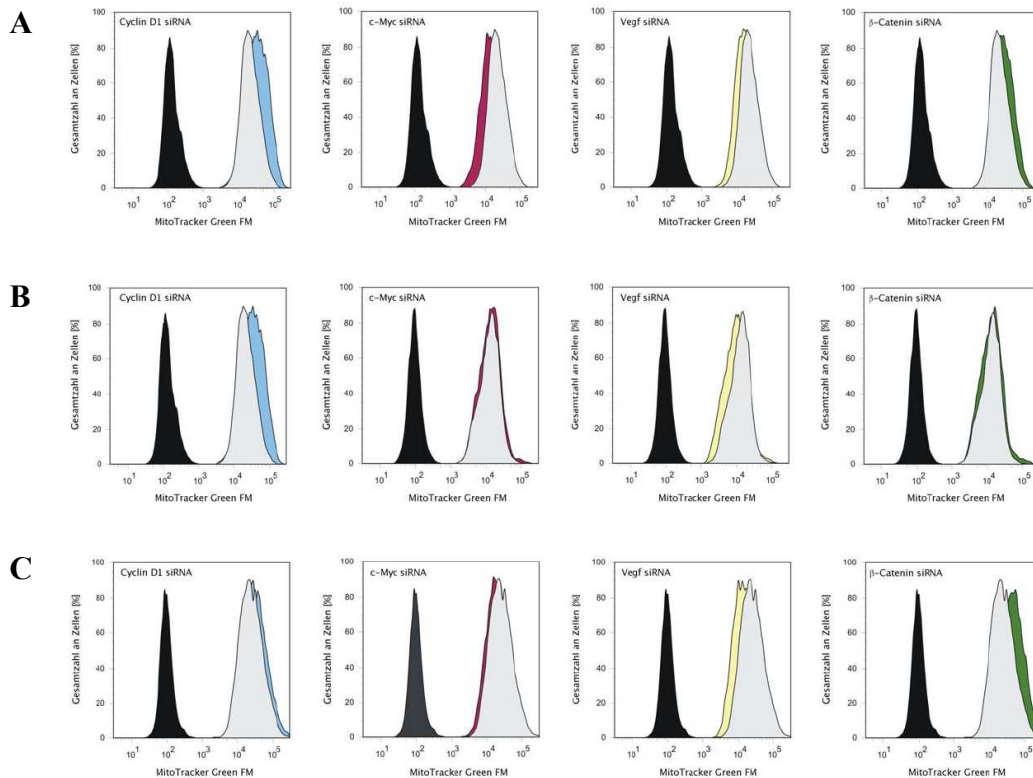
In SW480 Zellen (Abbildung 4.24) zeigte sich in Cyclin D1 siRNA behandelten Zellen eine stärkere MitoTracker Green FM-Markierung als in den Kontrollzellen. Dagegen war in VEGF siRNA transfizierten Zellen ein leichter Rückgang der Markierung zu verzeichnen. Sowohl die c-Myc siRNA als auch die  $\beta$ -Catenin siRNA hatten auf die Intensität der Mitochondrienmarkierung keinen Einfluss.

Mit Cyclin D1 siRNA behandelte HeLa Zellen (Abbildung 4.25) zeigten eine leichte Verstärkung der Mitochondrienmarkierung im Vergleich zu *non-targeting* siRNA transfizierten Zellen. Dies war ebenso für  $\beta$ -Catenin siRNA behandelte Zellen der Fall. Die Transfektion von c-Myc siRNA zeigte keinen Einfluss auf die MitoTracker Green FM-Markierung, während die Behandlung mit VEGF siRNA einen Rückgang zeigte.

#### **4.6.1.2 Bestimmung der Mitochondrienmasse mittels Durchflusszytometrie**

Für eine quantitative Aussage der Mitochondrienmasse wurden siRNA behandelte und mit dem Farbstoff MitoTracker<sup>®</sup> Green FM gefärbte HCT116, SW480 und HeLa Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Analyse erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.26 dargestellt.

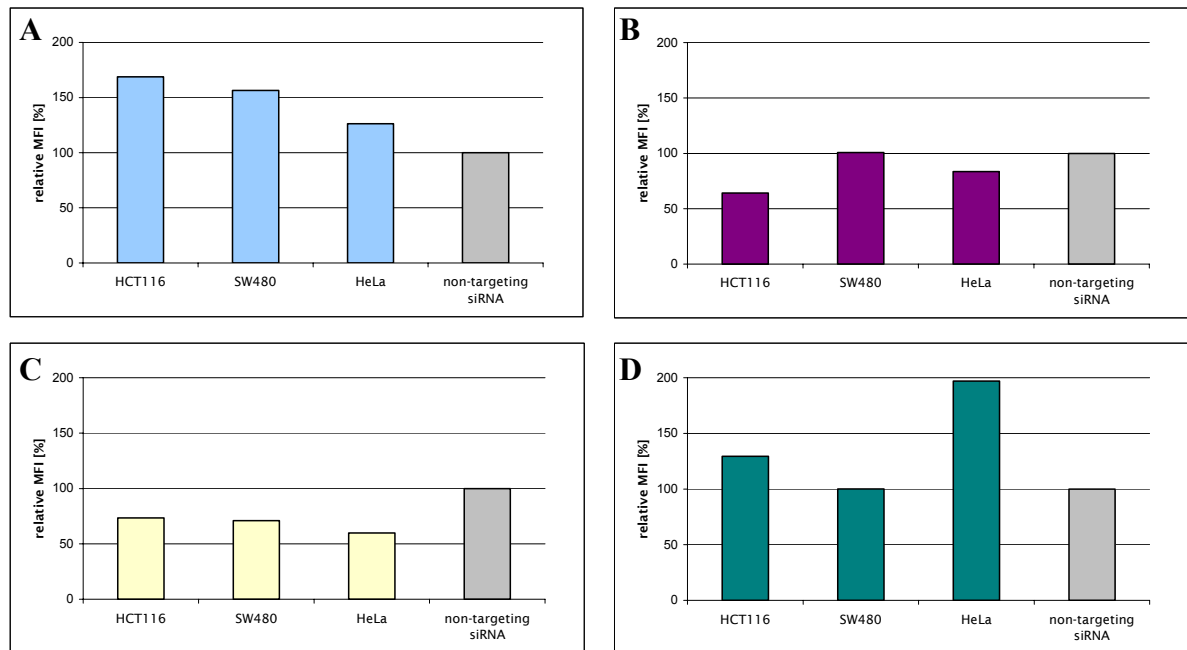
Die Behandlung der Zellen mit Cyclin D1 siRNA hatte in allen untersuchten Tumorzelllinien eine Erhöhung des MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Signals zur Folge. Im Gegensatz dazu war in c-Myc siRNA behandelten HCT116 und HeLa Zellen eine Senkung der Fluoreszenzintensität zu beobachten, während in SW480 Zellen keine Änderung zu verzeichnen war. Nach Transfektion der Zellen mit VEGF siRNA zeigte sich in allen Zelllinien ein Rückgang des MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Signals. Der Einfluss der  $\beta$ -Catenin siRNA wiederum war zellkontextabhängig. Hier war in HCT116 und HeLa Zellen eine Verstärkung der MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität zu beobachten, welche in letzteren etwa 100% betrug. In SW480 Zellen gab es keine Änderung.



**Abb. 4.26: Einfluss der Inaktivierung mittels RNA Interferenz auf die Mitochondrienmasse (A) in HCT116 Zellen, (B) in SW480 Zellen und (C) in HeLa Zellen.** Dargestellt ist die MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität der einzelnen Ansätze gegen die Gesamtzahl an Zellen. Die ungefärbten Zellen, welche keine Fluoreszenzmarkierung aufweisen, sind in schwarz dargestellt und bei den grau hinterlegten Ansätzen handelt es sich um *non-targeting* siRNA behandelte Kontrollzellen. Die Messung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion mit der betreffenden siRNA.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 4.27 und in Tabelle 4.15 zu sehen.





**Abb. 4.27:** Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Mitochondrienmasse in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist die relative MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität (MFI; *mean fluorescence intensity*) in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen. In diesen betrug die relative MFI 100%.

**Tab. 4.15:** Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Mitochondrienmasse in HCT116, SW480 und HeLa Zellen. Dargestellt ist die jeweilige relative MFI in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen die MFI 100% betrug.

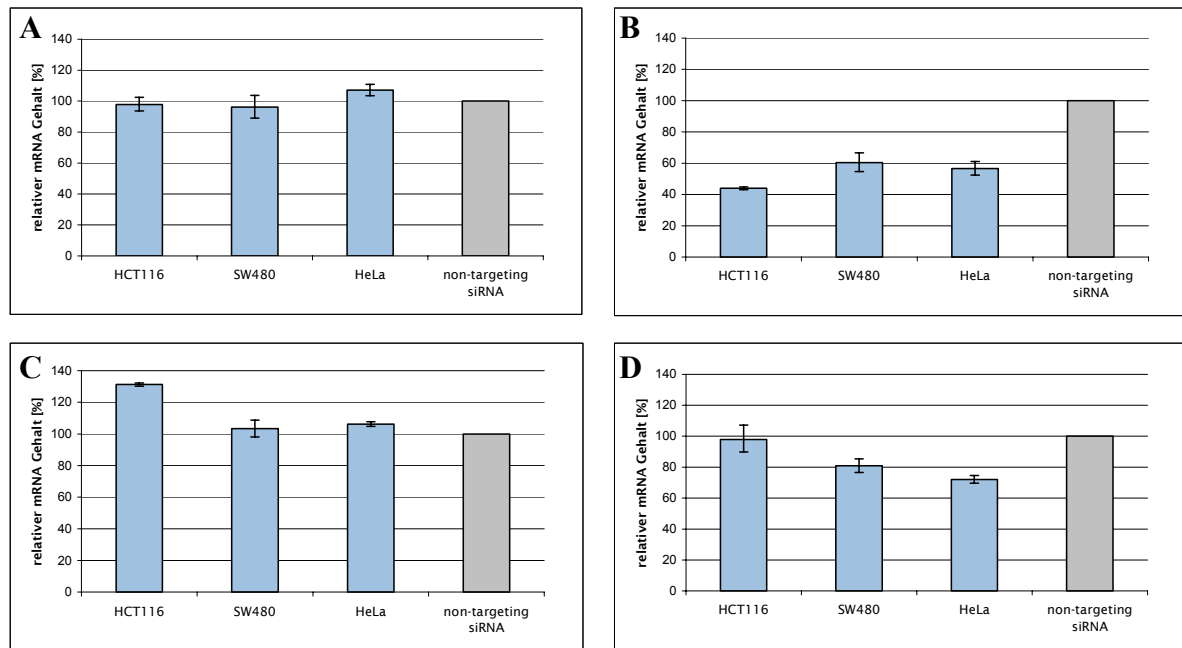
	HCT116 Zellen	SW480 Zellen	HeLa Zellen
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	169	156	126
<b>c-Myc siRNA</b>	64	101	83
<b>VEGF siRNA</b>	74	71	60
<b><math>\beta</math>-Catenin siRNA</b>	130	100	197

#### 4.6.2 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Stoffwechsellätigkeit

Um die Rolle des Wnt Signalwegs in der Energiegewinnung wärend der Tumorentwicklung nÄher zu charakterisieren, wurden in siRNA behandelten Zellen exemplarisch drei Gene mittels quantitativer *real-time* RT PCR analysiert, die in diesen Prozessen eine Rolle spielen. Zu diesen gehört unter anderem *HK2*, dessen Produkt Hexokinase-2 im ersten Schritt der Glykolyse die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat katalysiert. Dieses wird in weiteren Schritten zur ATP Gewinnung zu Pyruvat umgesetzt. Außerdem handelt es sich bei *HK2* um ein bekanntes c-Myc Zielgen (Kim *et al.*, 2004a). In dieser Arbeit diente der Hexokinase-2 mRNA Gehalt als Hinweis auf die Glykolyserate. Das Gen *PDHB* kodiert Pyruvat Dehydrogenase  $\beta$ . Diese ist Teil des Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplexes, welcher die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> katalysiert und so die Glykolyse mit dem Zitronensäurezyklus verbindet. Die Pyruvat Dehydrogenase ist in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Außerdem wurde das Gen *NDUFV1* (kodiert NADH Dehydrogenase Ubiquinon Flavoprotein 1) untersucht, das einen Teil des NADH Dehydrogenase Multienzymkomplexes kodiert. Die NADH Dehydrogenase, oder genauer NADH:Coenzym Q Oxidoreduktase, ist der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, welcher die Oxidation von NADH katalysiert und dies mit der Reduktion von Coenzym Q und dem Transport von Protonen über die Membran koppelt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Pyruvat Dehydrogenase  $\beta$  und NADH Dehydrogenase durch Cyclin D1 inhibiert werden. In dieser Arbeit dienten sie als Maß für die Mitochondrienaktivität (Sakamaki *et al.*, 2006).

In Abbildung 4.28 ist der Hexokinase-2 mRNA Gehalt in den siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen dargestellt.

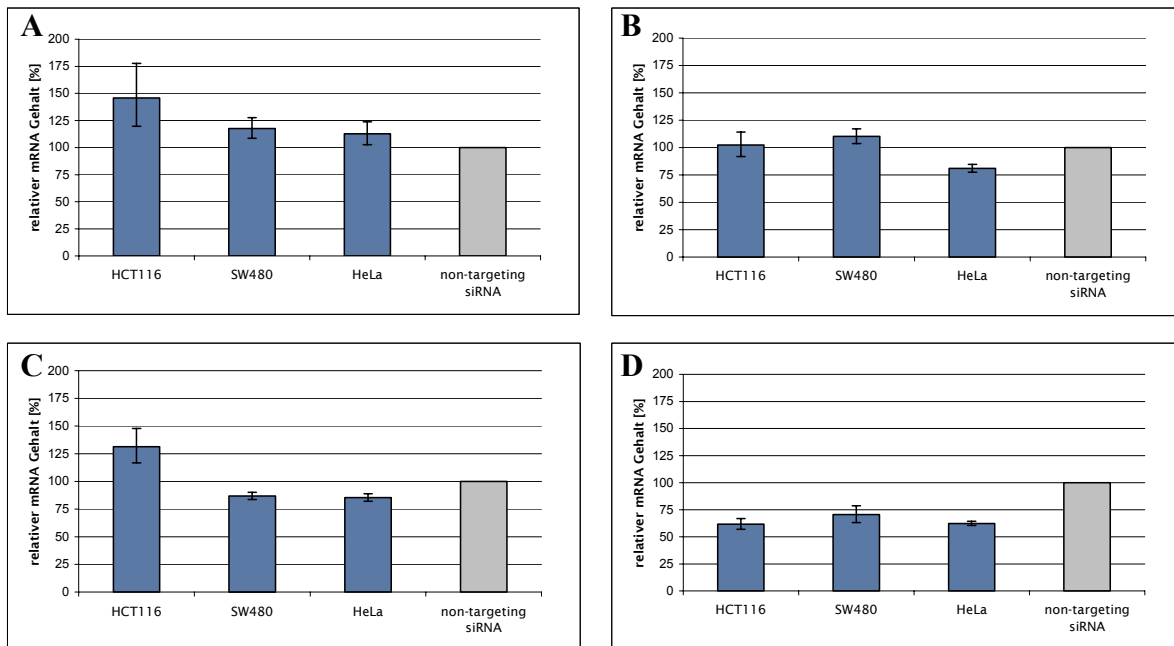
Die Transfektion von Cyclin D1 siRNA hatte in keiner der getesteten Zelllinien einen Einfluss auf die Hexokinase-2 mRNA Menge, wärend die Behandlung mit c-Myc siRNA zu einer Senkung des Hexokinase-2 mRNA Gehaltes um mindestens 40% führte. In HCT116 Zellen konnte eine Erhöhung des Hexokinase-2 mRNA Gehaltes durch Behandlung mit VEGF siRNA festgestellt werden, wohingegen in den anderen untersuchten Zelllinien keine Änderung beobachtet werden konnte. Die Transfektion mit  $\beta$ -Catenin siRNA wiederum führte nur in SW480 und HeLa Zellen zu einem Rückgang der Hexokinase-2 mRNA Menge um mindestens 19%.



**Abb. 4.28: Der Hexokinase-2 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Dargestellt ist der relative Hexokinase-2 mRNA Gehalt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der Hexokinase-2 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Als nächstes wurde der Pyruvat Dehydrogenase Gehalt auf mRNA Ebene untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.29 zu sehen.

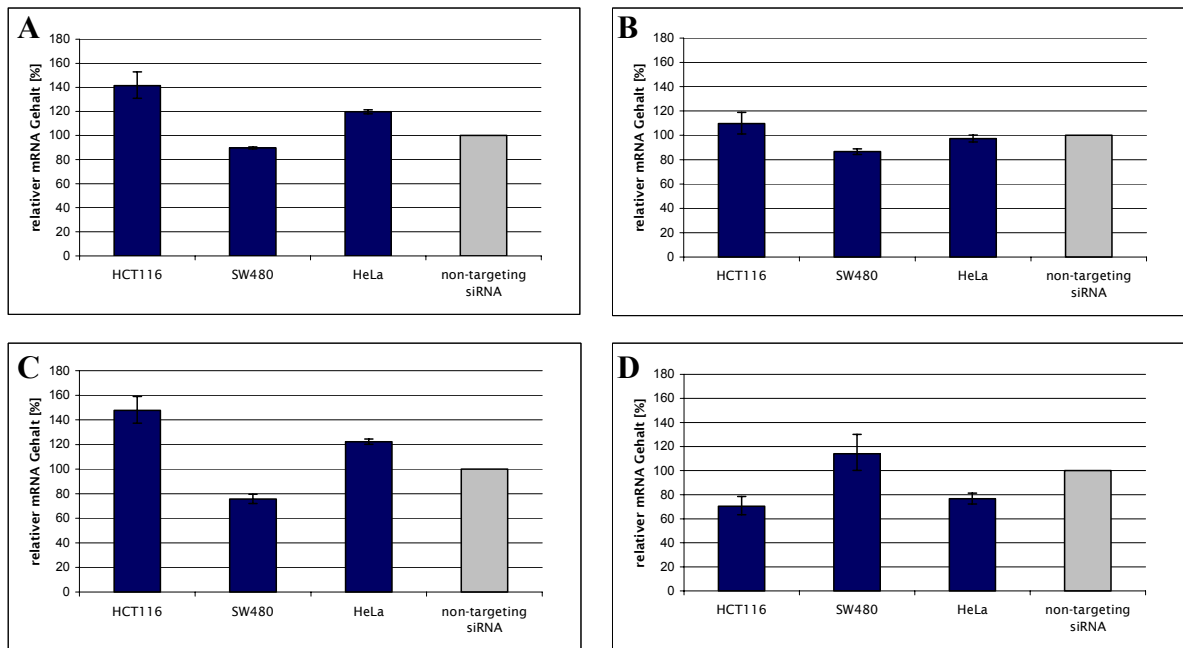
In HCT116 Zellen war für Cyclin D1 siRNA behandelte Zellen eine Erhöhung des Pyruvat Dehydrogenase mRNA Gehaltes zu beobachten, während weder in SW480 noch in HeLa Zellen eine Änderung zu verzeichnen war. Die Behandlung mit c-Myc siRNA hatte lediglich in HeLa Zellen einen Rückgang der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Menge um 19% zur Folge. In HCT116 Zellen führte die Verwendung der VEGF siRNA zu einer Erhöhung des Pyruvat Dehydrogenase Gehaltes um 31%, während sich sowohl in SW480 als auch in HeLa Zellen ein Rückgang um 13% beziehungsweise 15% zeigte. Die Behandlung der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer Senkung der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Menge um mindestens 30%.



**Abb. 4.29:** Der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative Pyruvat Dehydrogenase mRNA Gehalt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Zuletzt wurde die Menge der NADH Dehydrogenase auf mRNA Ebene analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

Während die Transfektion von Cyclin D1 siRNA in HCT116 und HeLa Zellen zu einer Erhöhung des NADH Dehydrogenase mRNA Gehaltes um mindestens 20% führte, wurde in SW480 Zellen keine Änderung beobachtet. Die Behandlung der Zellen mit c-Myc siRNA zeigte in keiner der untersuchten Zelllinien eine Veränderung der NADH Dehydrogenase mRNA Menge. Die Verwendung der VEGF siRNA dagegen führte in HCT116 und HeLa Zellen zu einer Erhöhung der betreffenden mRNA Menge um mindestens 22% und in SW480 Zellen zu einer Senkung um 24%. Die Transfektion von  $\beta$ -Catenin siRNA führte in HCT116 und HeLa Zellen zu einer Senkung des NADH Dehydrogenase mRNA Gehaltes um mindestens 23%. In SW480 wurde keine Änderung beobachtet.



**Abb. 4.30:** Der NADH Dehydrogenase mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative NADH Dehydrogenase mRNA Gehalt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der NADH Dehydrogenase mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Eine Zusammenfassung der beschriebenen Ergebnisse ist in Tabelle 4.16 zu finden.

**Tab. 4.16: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Stoffwechselftigkeit und Mitochondrienfunktion in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist der jeweilige mRNA Gehalt in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen die betreffende mRNA Menge 100% betrug.

	<b>HCT116 Zellen</b>		
	Hexokinase-2	Pyruvat Dehydrogenase	NADH Dehydrogenase
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	98 ± 4	146 ± 32	141 ± 11
<b>c-Myc siRNA</b>	44 ± 1	102 ± 12	110 ± 9
<b>VEGF siRNA</b>	131 ± 1	131 ± 16	148 ± 11
<b>β-Catenin siRNA</b>	98 ± 9	62 ± 5	70 ± 8
	<b>SW480 Zellen</b>		
	Hexokinase-2	Pyruvat Dehydrogenase	NADH Dehydrogenase
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	96 ± 8	118 ± 10	90 ± 1
<b>c-Myc siRNA</b>	60 ± 6	110 ± 7	87 ± 2
<b>VEGF siRNA</b>	103 ± 5	87 ± 3	76 ± 4
<b>β-Catenin siRNA</b>	81 ± 4	70 ± 8	114 ± 16
	<b>HeLa Zellen</b>		
	Hexokinase-2	Pyruvat Dehydrogenase	NADH Dehydrogenase
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	107 ± 4	113 ± 11	120 ± 2
<b>c-Myc siRNA</b>	57 ± 4	81 ± 4	97 ± 3
<b>VEGF siRNA</b>	106 ± 1	85 ± 3	122 ± 2
<b>β-Catenin siRNA</b>	72 ± 3	62 ± 2	77 ± 5

### 4.6.3 Zusammenfassung des Einflusses auf den Energiemetabolismus

Die Veränderungen im Energiemetabolismus siRNA behandelter HCT116, SW480 und HeLa Zellen sind in Tabelle 4.17 zusammengefasst.

**Tab. 4.17: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Mitochondrienfunktion und den Stoffwechsel von Tumorzelllinien.** Zu sehen sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. – bezeichnet einen Rückgang, während + eine Erhöhung anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen.

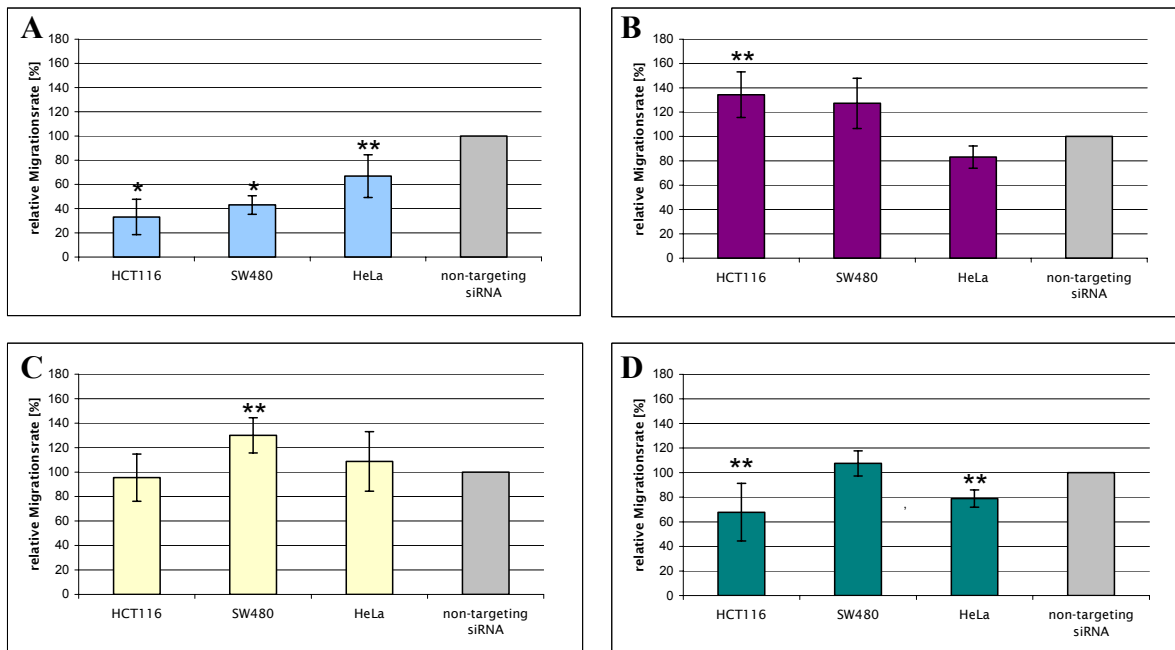
		Aerobe Glykolyse	Mitochondrien- masse	Mitochondrien- aktivität
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	+	+
	SW480 Zellen	○	+	+
	HeLa Zellen	○	+	+
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	–	–	○
	SW480 Zellen	–	○	○
	HeLa Zellen	–	○	○
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	–	+
	SW480 Zellen	○	–	–
	HeLa Zellen	○	–	–
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	–	+	–
	SW480 Zellen	–	○	○
	HeLa Zellen	–	+	–

## 4.7 Regulation der Zellmigration durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene

In dieser Arbeit wurden ebenfalls die Zellmigration und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten untersucht, da diese Prozesse wichtige Kennzeichen der Karzinogenese sind. Tumorzellen weisen in der Regel eine gesteigerte Migration und eine geringere Adhäsion auf. Aus diesem Grund sollte der Einfluss des Wnt Signalwegs und der ausgewählten Zielgene Cyclin D1, c-Myc und VEGF auf die Migration von Tumorzellen analysiert werden. Hierfür wurden HCT116, SW480 und HeLa Zellen mit der betreffenden siRNA transfiziert.

### 4.7.1 Bestimmung der Zellmigration mittels Transwell-Migrationsassay

Zur Untersuchung der Zellmigration wurde als erstes ein Transwell-Migrationsassay mit siRNA behandelten Zellen durchgeführt, bei dem die Zellen durch eine Membran wandern. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.31 zu sehen.



**Abb. 4.31: Einfluss der jeweiligen siRNA auf die Migration in HCT116, SW480 und HeLa Zellen im Transwell-Migrationsassay (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Dargestellt ist die relative Migrationsrate nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA und Serumentzug. Die Migrationsrate in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. \* bezeichnet  $P < 0,005$ , \*\*  $P < 0,05$ .  $n = 4$  beziehungsweise  $n = 3$  (HCT116 Zellen und c-Myc siRNA; SW480 Zellen und *non-targeting* siRNA).

Nach Behandlung der Zellen mit Cyclin D1 siRNA war in allen untersuchten Zelllinien ein Rückgang der Migrationsrate um bis zu 67% zu beobachten. Dagegen zeigte die Transfektion von c-Myc siRNA lediglich in HCT116 Zellen eine Verstärkung der Migration um 34%, während die Verwendung der VEGF siRNA in SW480 Zellen zu einer Verstärkung um 30% führte. Nach Behandlung von HCT116 und HeLa Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA war ein Rückgang der Migrationsrate um mindestens 21% zu verzeichnen, wohingegen in SW480 Zellen keine Änderung zu beobachten war.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.18 dargestellt.



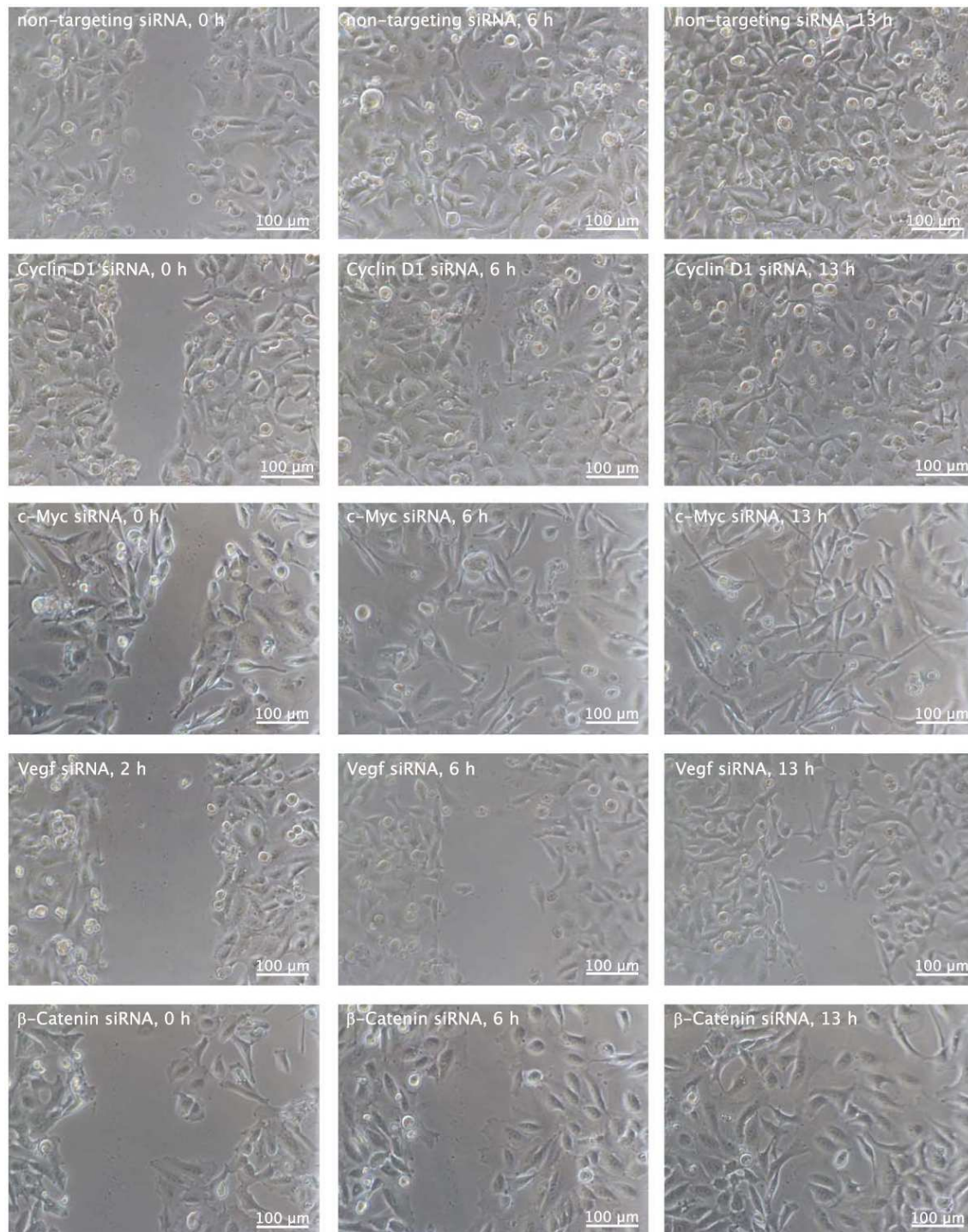
**Tab. 4.18: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migrationsrate in HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist die relative Migrationsrate in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen die Migration der Zellen 100% betrug. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests. (\*) bezeichnet  $P < 0,005$ , (\*\*)  $P < 0,05$ .

	<b>HCT116 Zellen</b>	<b>SW480 Zellen</b>	<b>HeLa Zellen</b>
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	33 ± 15 (*)	43 ± 8 (*)	67 ± 18 (**)
<b>c-Myc siRNA</b>	134 ± 19 (**)	127 ± 21	83 ± 9
<b>VEGF siRNA</b>	95 ± 19	130 ± 14 (**)	109 ± 24
<b>β-Catenin siRNA</b>	68 ± 23 (**)	108 ± 10	79 ± 7 (**)

#### 4.7.2 Bestimmung der Zellmigration mittels Wundheilungsassay

Zur Bestimmung der eindimensionalen Migration wurde in siRNA behandelten HeLa Zellen ein Wundheilungsassay durchgeführt. Dafür wurde 48 Stunden nach Transfektion einem konfluenten *Monolayer* von Zellen eine „Wunde“ durch Abschaben der Zellen in einer ungefähr 100 bis 150 µm breiten Spur zugefügt. Diese wurde in einem Abstand von jeweils einer Stunde fotografiert, um die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Einwanderns der Zellen in diese Spur festzuhalten. Ein Überblick über die Experimente ist in Abbildung 4.32 zu sehen.

In *non-targeting* siRNA behandelten HeLa Zellen war die Wunde bereits nach fünf Stunden vollständig geschlossen. c-Myc siRNA behandelte Zellen benötigten etwa sieben Stunden um einen vergleichbaren Zustand zu erreichen. Im Gegensatz dazu ließen sowohl Cyclin D1 siRNA und β-Catenin siRNA behandelte Zellen als auch VEGF siRNA transfizierte Zellen eine Verlangsamung der Migration erkennen. Hier wurde ein konfluenter *Monolayer* erst nach zwölf Stunden (Cyclin D1 siRNA), 13 Stunden (β-Catenin siRNA) beziehungsweise über Nacht (VEGF siRNA) erreicht.



**Abb. 4.32: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migration in HeLa Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentativer Überblick der Migration nach Behandlung der Zellen mit der jeweiligen siRNA 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen.

Die Zeitpunkte bis zum Schließen der Wunde für siRNA behandelte HeLa Zellen sind in Tabelle 4.19 aufgeführt.

**Tab. 4.19: Einfluss der siRNA Behandlung auf die Migration in HeLa Zellen.** Dargestellt sind die Zeitpunkte der siRNA behandelten Zellen bis zum vollständigen Schließen der Wunde.

	<b>HeLa Zellen</b>
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	10 Stunden
<b>c-Myc siRNA</b>	7 Stunden
<b>VEGF siRNA</b>	über Nacht
<b><math>\beta</math>-Catenin siRNA</b>	13 Stunden
<b>non-targeting siRNA</b>	5 Stunden

### 4.7.3 Einfluss des Wnt Signalwegs auf das Aktinzytoskelett

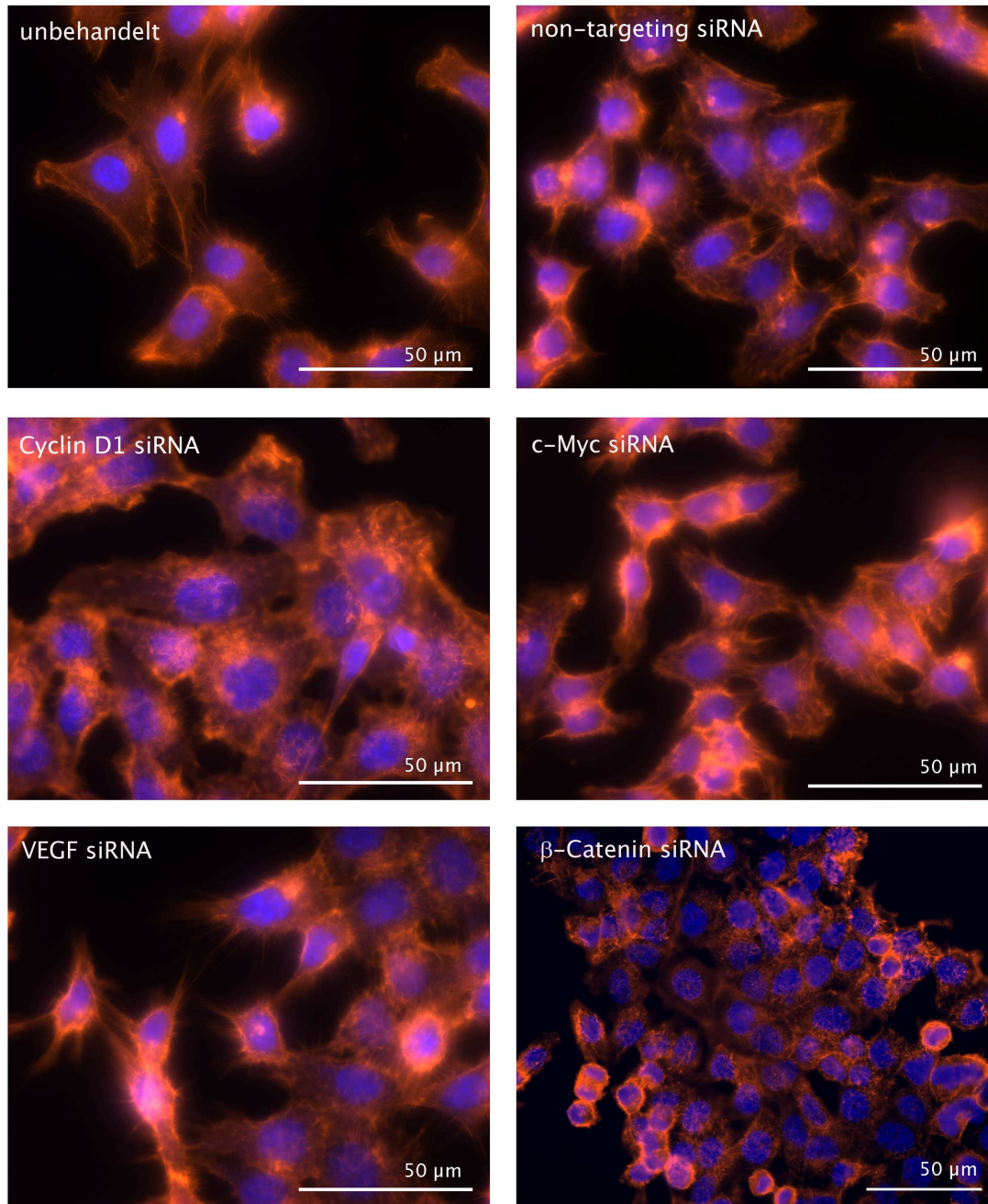
Das Aktinzytoskelett befindet sich unterhalb der Zellmembran und bestimmt die Zellform und Polarität. Da es außerdem die Bewegung und Teilung von Zellen reguliert, wurde es in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Zellmigration eingehender untersucht (Hall, 1998). Dies erfolgte mit Hilfe einer Phalloidin-Markierung der Zellen. Zunächst wurden siRNA behandelte Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Darüber hinaus wurde eine nähere Bestimmung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

#### 4.7.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Phalloidin/TRITC markierter Zellen

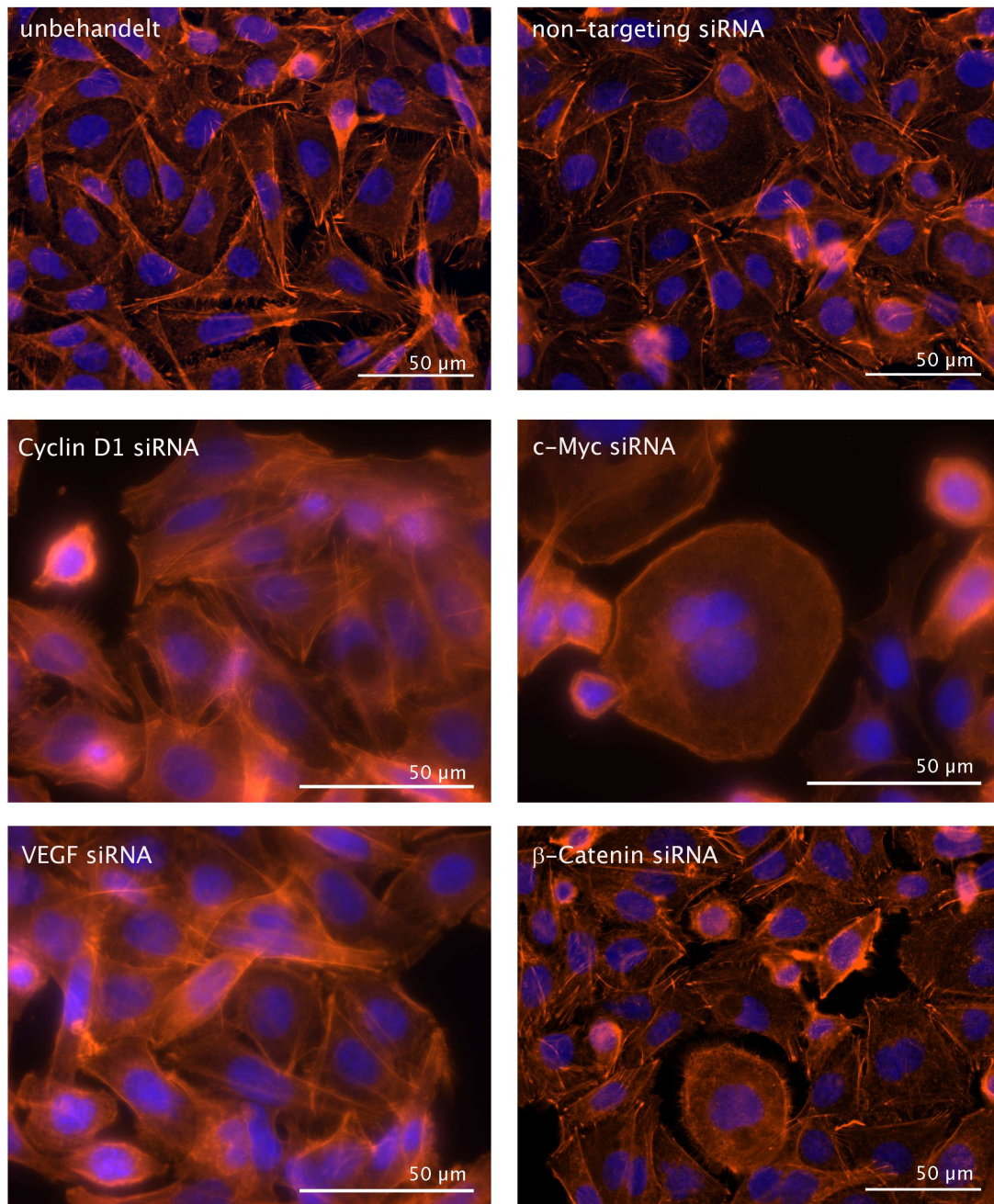
Die Untersuchung des Aktinzytoskeletts in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in siRNA behandelten Zellen ist in den Abbildungen 4.33 bis 4.35 zu sehen.

In Cyclin D1 siRNA behandelten HCT116 Zellen (Abbildung 4.33) war eine großflächige Ausbreitung des Aktinzytoskeletts zu beobachten. Außerdem erschien das F-Aktin in diesen Zellen ungeordnet. Die Transfektion von c-Myc siRNA hatte dagegen keine Änderungen des Aktinzytoskeletts zur Folge. Mit VEGF siRNA behandelte Zellen zeigten ebenfalls keinen deutlichen Effekt, während mit  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte HCT116 Zellen eine ungeordnete F-Aktin Struktur aufwiesen. Mit Cyclin D1 siRNA behandelte SW480 Zellen (Abbildung 4.34) zeigten eine großflächige Verteilung des Aktinzytoskeletts, wohingegen in anderen behandelten Zellen kein Effekt beobachtet werden konnte. Cyclin D1 siRNA behandelte HeLa Zellen (Abbildung 4.35) zeigten eine deutliche Ausbildung von Filopodien. Dagegen wiesen c-Myc siRNA transfizierte Zellen eine schmale, lang gestreckte Form auf.

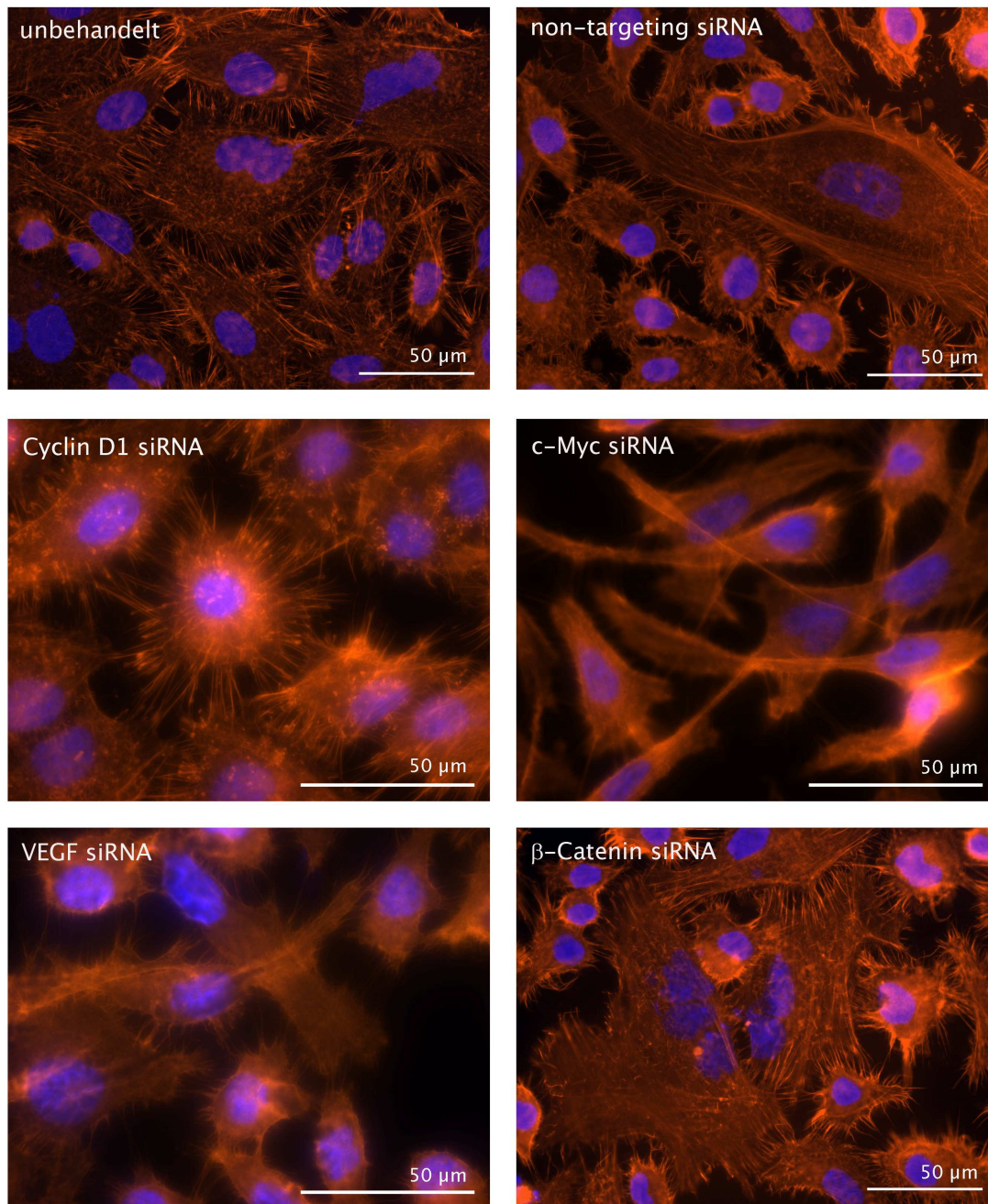
In VEGF siRNA und  $\beta$ -Catenin siRNA behandelten Zellen erschien die F-Aktin Struktur ungeordnet.



**Abb. 4.33: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Aktin (Phalloidin/TRITC; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienen mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



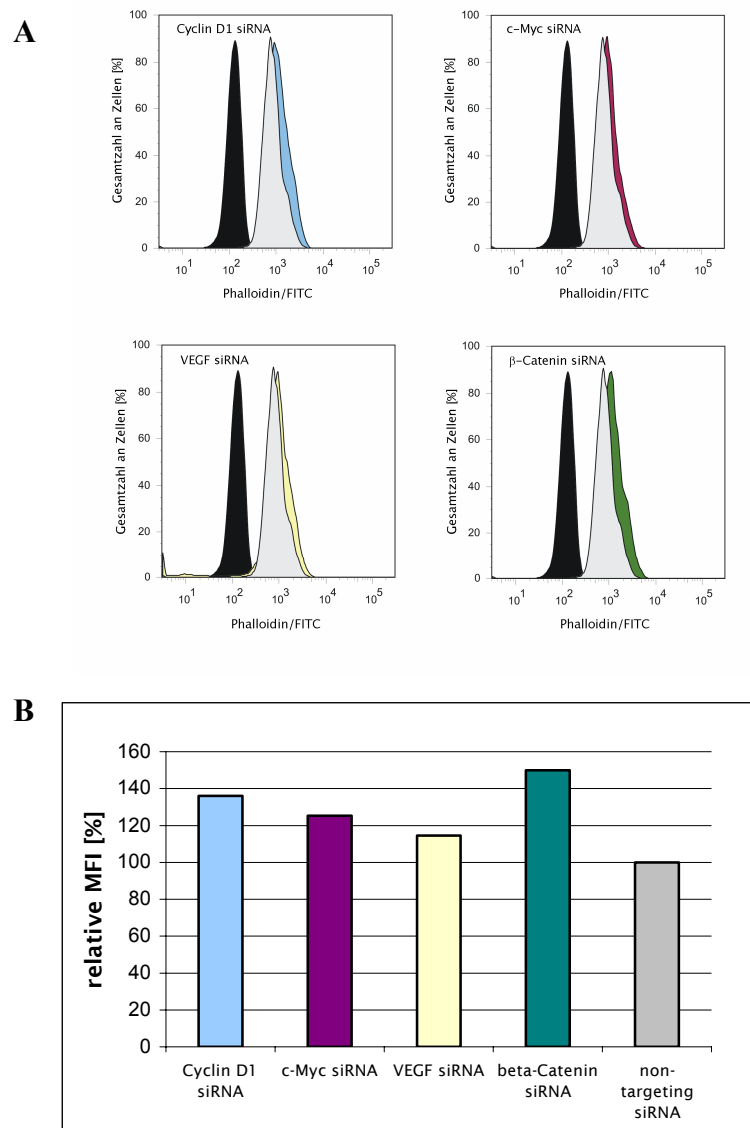
**Abb. 4.34: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Aktin (Phalloidin/TRITC; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.35: Das Aktinzytoskelett in siRNA behandelten HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Aktin (Phalloidin/TRITC; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.

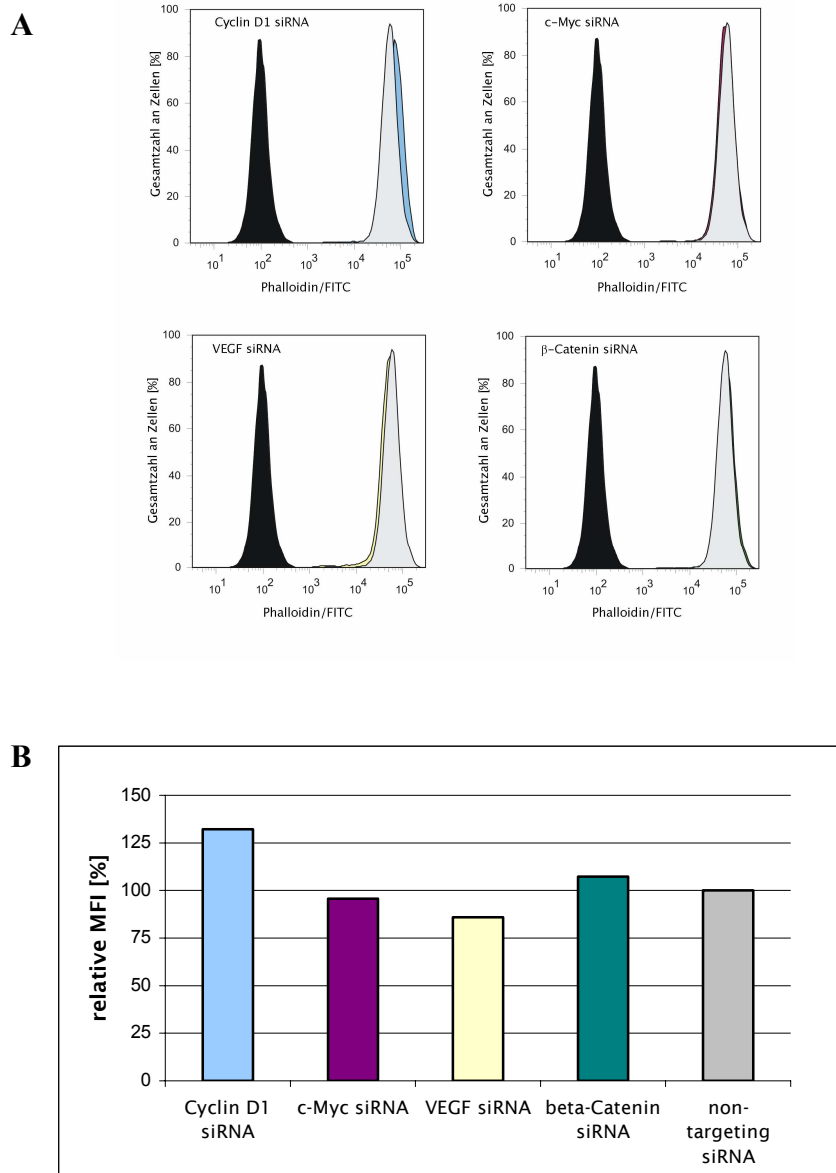
### 4.7.3.2 Bestimmung des F-Aktin Gehaltes mittels Durchflusszytometrie

Als nächstes folgte die Untersuchung des F-Aktin Gehaltes von siRNA behandelten HCT116 und SW480 Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dafür wurden die Zellen mit Phalloidin/FITC markiert und anschließend untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.36 beziehungsweise 4.37 zu sehen und in Tabelle 4.20 zusammengefasst.



**Abb. 4.36: Einfluss der jeweiligen siRNA auf den F-Aktin Gehalt in HCT116 Zellen. (A) Darstellung der Phalloidin/FITC Fluoreszenzintensität der einzelnen Ansätze gegen die Gesamtzahl an Zellen. Die ungefärbten Zellen, welche keine Fluoreszenzmarkierung aufweisen, sind in schwarz dargestellt und bei den grau hinterlegten Ansätzen handelt es sich um *non-targeting* siRNA behandelte Kontrollzellen. Die Messung erfolgte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion mit der betreffenden siRNA. (B) Diagramm der Analyse mittels Durchflusszytometrie. Hier ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der siRNA behandelten Zellen in Prozent angegeben. Die MFI der *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen betrug 100%.**

In HCT116 Zellen war in allen siRNA behandelten Zellen eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dies war mit etwa 40% insbesondere für Cyclin D1 siRNA und  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen der Fall.



**Abb. 4.37: Einfluss der jeweiligen siRNA auf den F-Aktin Gehalt in SW480 Zellen. (A) Darstellung der Phalloidin/FITC Fluoreszenzintensität der einzelnen Ansätze gegen die Gesamtzahl an Zellen.** Die ungefärbten Zellen, welche keine Fluoreszenzmarkierung aufweisen, sind in schwarz dargestellt und bei den grau hinterlegten Ansätzen handelt es sich um *non-targeting* siRNA behandelte Kontrollzellen. Die Messung erfolgte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion mit der betreffenden siRNA. **(B) Diagramm der Analyse mittels Durchflusszytometer.** Hier ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der siRNA behandelten Zellen in Prozent angegeben. Die MFI der *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen betrug 100%.



In siRNA behandelten SW480 Zellen zeigte sich mit Ausnahme von Cyclin D1 siRNA transfizierten Zellen kein Effekt auf die Fluoreszenzintensität. Dort war eine Erhöhung des Signals um 32% zu beobachten.

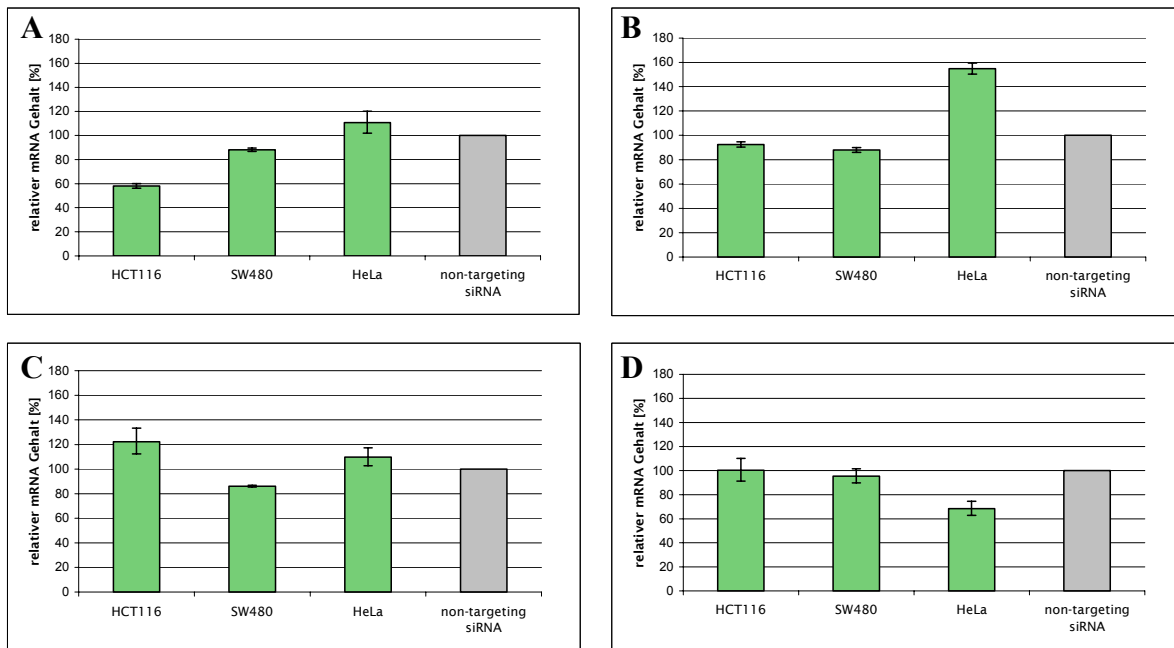
**Tab. 4.20: Einfluss der siRNA Behandlung auf den F-Aktin Gehalt in HCT116 und SW480 Zellen.** Dargestellt ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen die MFI 100% betrug.

	HCT116 Zellen	SW480 Zellen
Cyclin D1 siRNA	136	132
c-Myc siRNA	125	96
VEGF siRNA	115	86
$\beta$ -Catenin siRNA	150	107

#### 4.7.4 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Transkription anti-migratorischer Gene

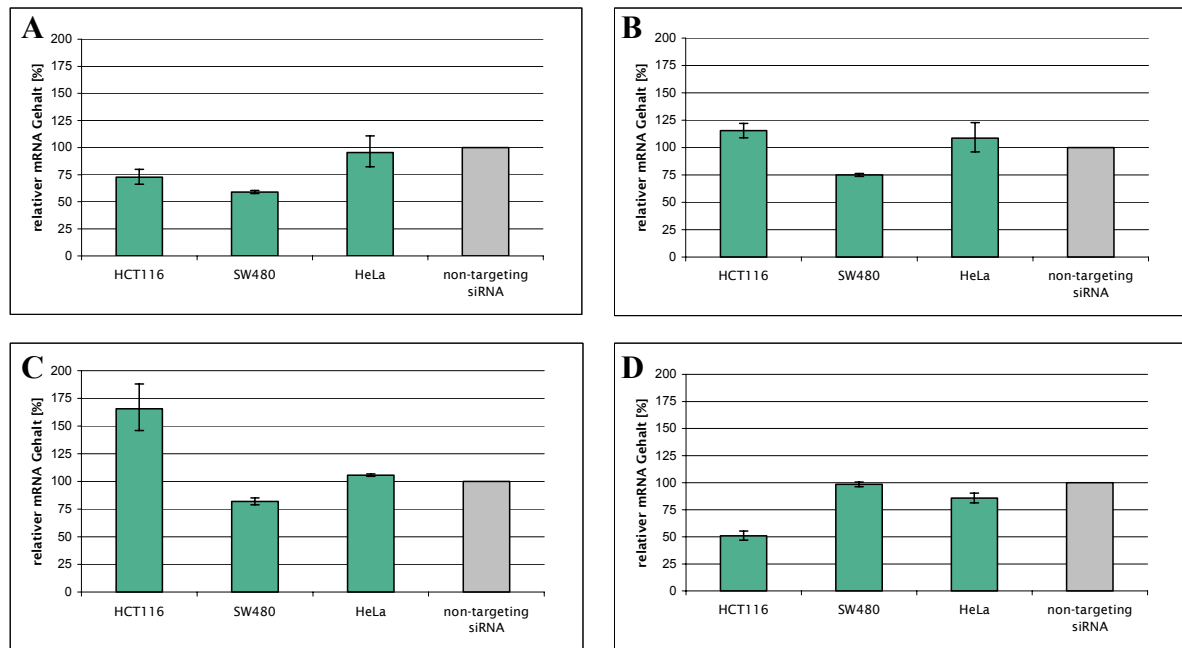
Weiterhin sollte die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration näher charakterisiert werden. Dazu wurde exemplarisch die Transkription der anti-migratorischen Gene *TSP1* (kodiert Thrombospondin-1) und *ROCK2* untersucht. Der Gehalt an TSP1 und ROCK2 wurde auf mRNA Ebene mittels quantitativer *real-time* RT PCR in siRNA behandelten Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.38 und 4.39 zu sehen.

Die Verwendung von Cyclin D1 siRNA führte in HCT116 Zellen zu einem Rückgang des Thrombospondin-1 mRNA Gehaltes um 42%, wohingegen in SW480 und HeLa Zellen keine Änderung zu verzeichnen war. Nach c-Myc siRNA Behandlung zeigten lediglich HeLa Zellen eine Erhöhung der Thrombospondin-1 mRNA Menge um 55%. Die Transfektion von VEGF siRNA hatte in HCT116 Zellen eine Erhöhung um 22% und in SW480 Zellen eine Senkung um 14% zur Folge. In HeLa Zellen zeigte sich keine Änderung. Die Behandlung der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA führte lediglich in HeLa Zellen zu einem Rückgang der Thrombospondin-1 mRNA Menge um 32%.



**Abb. 4.38: Der Thrombospondin-1 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung.** Dargestellt ist der relative Thrombospondin-1 mRNA Gehalt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der Thrombospondin-1 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Als nächstes folgte die Untersuchung des ROCK2 mRNA Gehaltes siRNA behandelter Zellen. Nach Cyclin D1 siRNA Behandlung wurde sowohl in HCT116 als auch in SW480 Zellen eine Senkung des ROCK2 mRNA Gehaltes um 27% beziehungsweise 41% festgestellt, während für HeLa Zellen keine Änderung beobachtet werden konnte. Die Transfektion von c-Myc siRNA führte lediglich in SW480 Zellen zu einem Rückgang des betreffenden mRNA Gehaltes um 25%. Dagegen zeigte sich nach VEGF siRNA Behandlung in HCT116 Zellen eine Erhöhung der ROCK2 mRNA Menge um 66% und in SW480 Zellen eine Senkung um 18%. In HeLa Zellen zeigte sich keine Änderung. Nach Transfektion der Zellen mit  $\beta$ -Catenin siRNA war in HCT116 und HeLa Zellen ein Rückgang des ROCK2 mRNA Gehaltes um 49% beziehungsweise 14% zu verzeichnen, während in SW480 Zellen keine Änderung beobachtet wurde.



**Abb. 4.39:** Der ROCK2 mRNA Gehalt in HCT116, SW480 und HeLa Zellen (A) nach Cyclin D1 siRNA Behandlung, (B) nach c-Myc siRNA Behandlung, (C) nach VEGF siRNA Behandlung und (D) nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung. Dargestellt ist der relative ROCK2 mRNA Gehalt 24 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Der ROCK2 mRNA Gehalt in den mit *non-targeting* siRNA behandelten Kontrollzellen betrug 100%. n = 3 beziehungsweise n = 2 (aus 4 Ansätzen) für  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen.

Die Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT PCR Analyse sind in Tabelle 4.21 zusammengefasst.

**Tab. 4.21: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Transkription anti-migratorischer Gene in siRNA behandelten HCT116, SW480 und HeLa Zellen.** Dargestellt ist der jeweilige mRNA Gehalt in Prozent im Vergleich zu *non-targeting* siRNA behandelten Zellen, in denen die betreffende mRNA Menge 100% betrug.

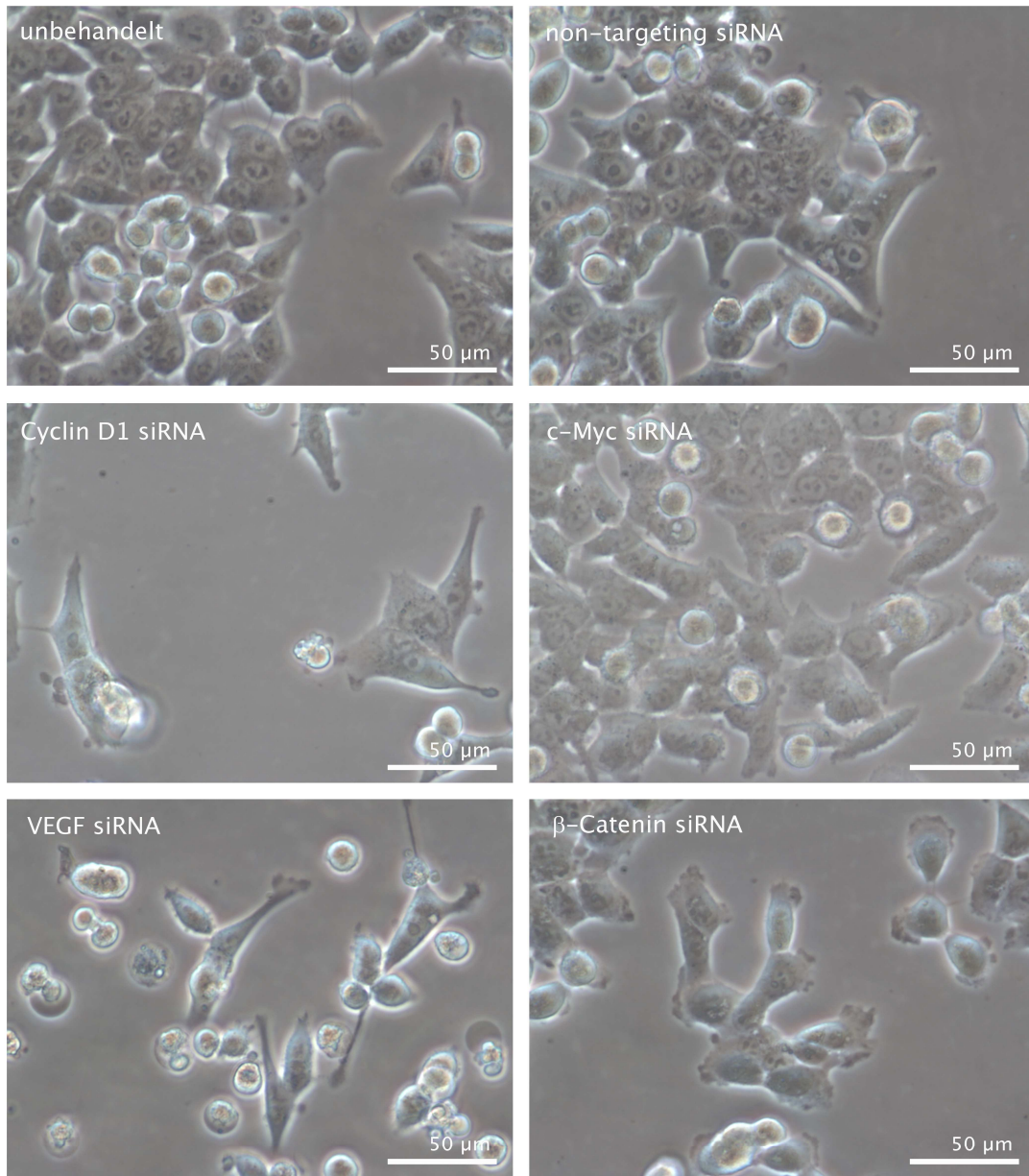
	<b>HCT116 Zellen</b>	
	Thrombospondin-1	ROCK2
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	58 ± 2	73 ± 7
<b>c-Myc siRNA</b>	92 ± 2	115 ± 7
<b>VEGF siRNA</b>	122 ± 11	166 ± 22
<b>β-Catenin siRNA</b>	100 ± 10	51 ± 4
	<b>SW480 Zellen</b>	
	Thrombospondin-1	ROCK2
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	88 ± 1	59 ± 1
<b>c-Myc siRNA</b>	88 ± 2	75 ± 1
<b>VEGF siRNA</b>	86 ± 1	82 ± 3
<b>β-Catenin siRNA</b>	95 ± 6	98 ± 2
	<b>HeLa Zellen</b>	
	Thrombospondin-1	ROCK2
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	111 ± 10	95 ± 15
<b>c-Myc siRNA</b>	155 ± 5	109 ± 14
<b>VEGF siRNA</b>	110 ± 8	106 ± 1
<b>β-Catenin siRNA</b>	68 ± 6	86 ± 5

#### 4.7.5 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Zellmorphologie

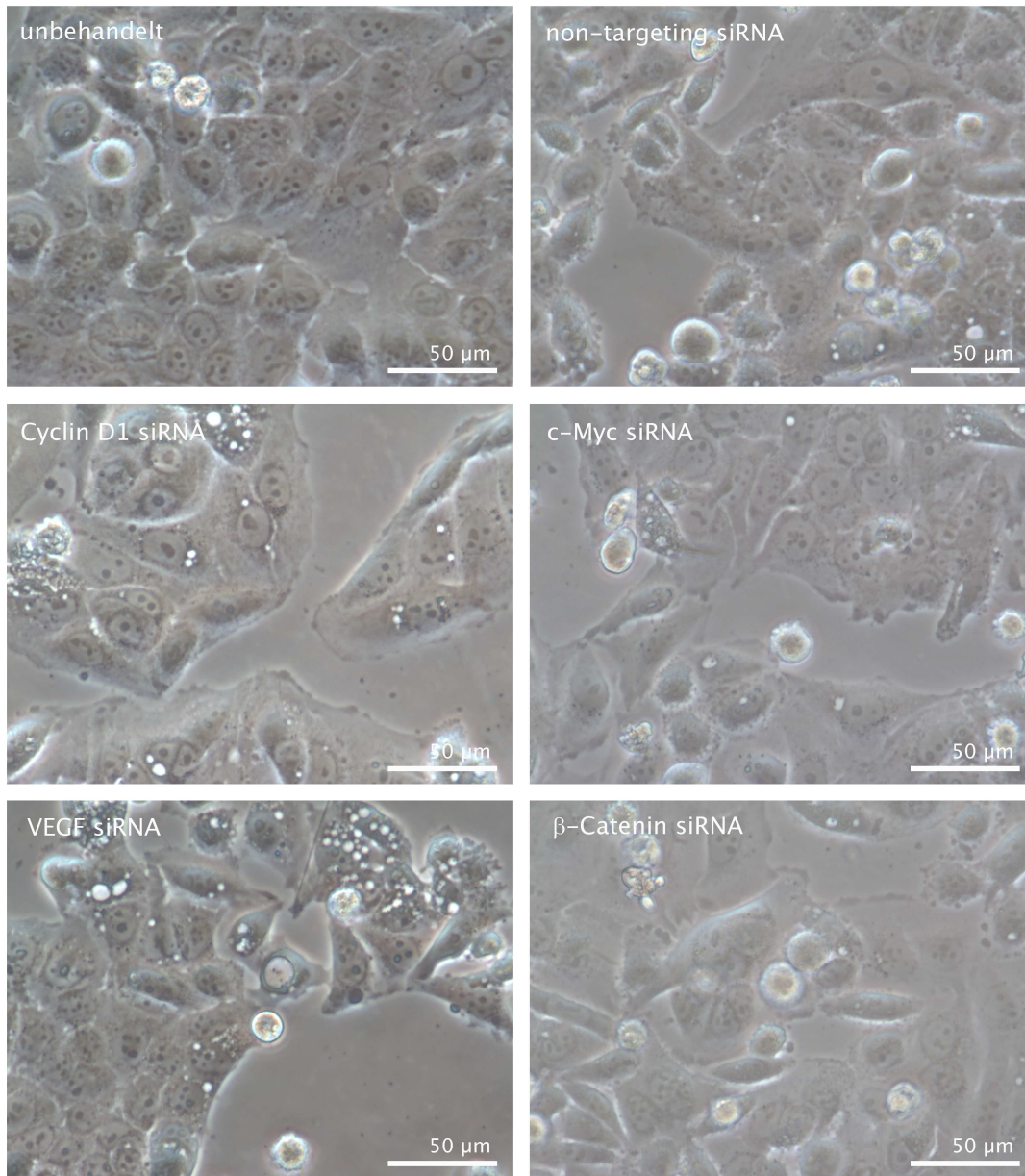
Zur weiteren Analyse des Zellzytoskeletts wurde ebenfalls die Zellmorphologie im Zusammenhang mit dem Wnt Signalweg und seinen Zielgenen bestimmt. Dafür wurden siRNA behandelte Zellen zum einen durch lichtmikroskopische Aufnahmen und zum anderen durch Tubulin-Markierung untersucht.

#### 4.7.5.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen siRNA behandelter Zellen

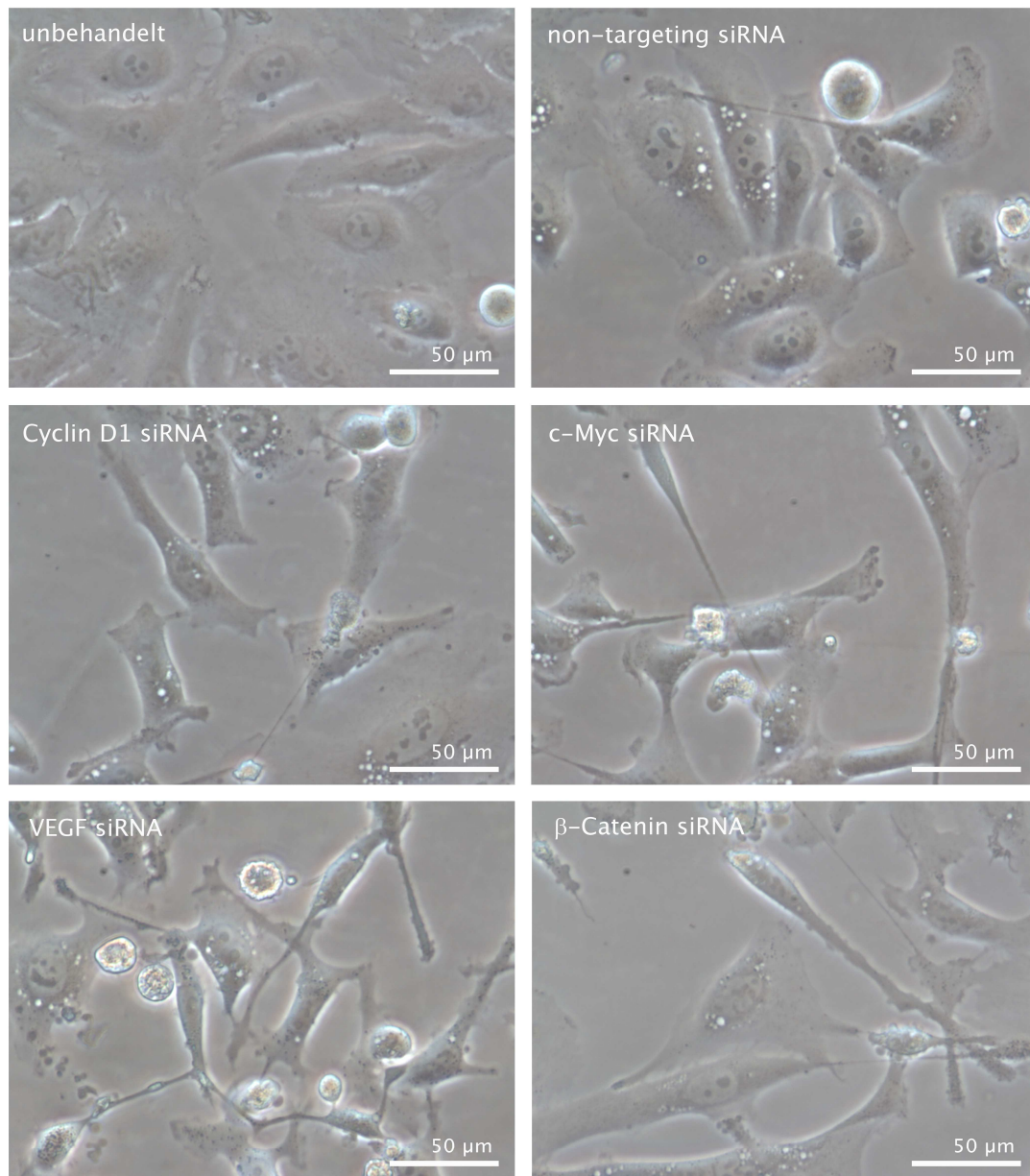
In den Abbildungen 4.40 bis 4.42 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit siRNA transfizierten Zellen zu sehen.



**Abb. 4.40: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in HCT116 Zellen.** Zu sehen sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 25fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.41: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in SW480 Zellen.** Zu sehen sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 25fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.42: Effekte der Transfektion von siRNA gegen ausgewählte Wnt Zielgene auf die Zellmorphologie in HeLa Zellen.** Zu sehen sind lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 25fachen Vergrößerung.

Im Gegensatz zu den Kontrollzellen erschienen Cyclin D1 siRNA behandelte HCT116 Zellen (Abbildung 4.40) großflächig, während c-Myc siRNA transfizierte Zellen keine auffälligen Änderungen zeigten. Mit VEGF siRNA behandelte HCT116 Zellen waren schmal und lang gestreckt. Außerdem waren in diesem Ansatz viele tote Zellen zu beobachten. Die Verwendung von  $\beta$ -Catenin siRNA hatte keine auffälligen Änderungen der Zellmorphologie zur Folge.

Mit Cyclin D1 siRNA transfizierte SW480 Zellen (Abbildung 4.41) erschienen im Vergleich zu den Kontrollzellen großflächig, während in anderen behandelten SW480 Zellen keine morphologischen Änderungen erkennbar waren.

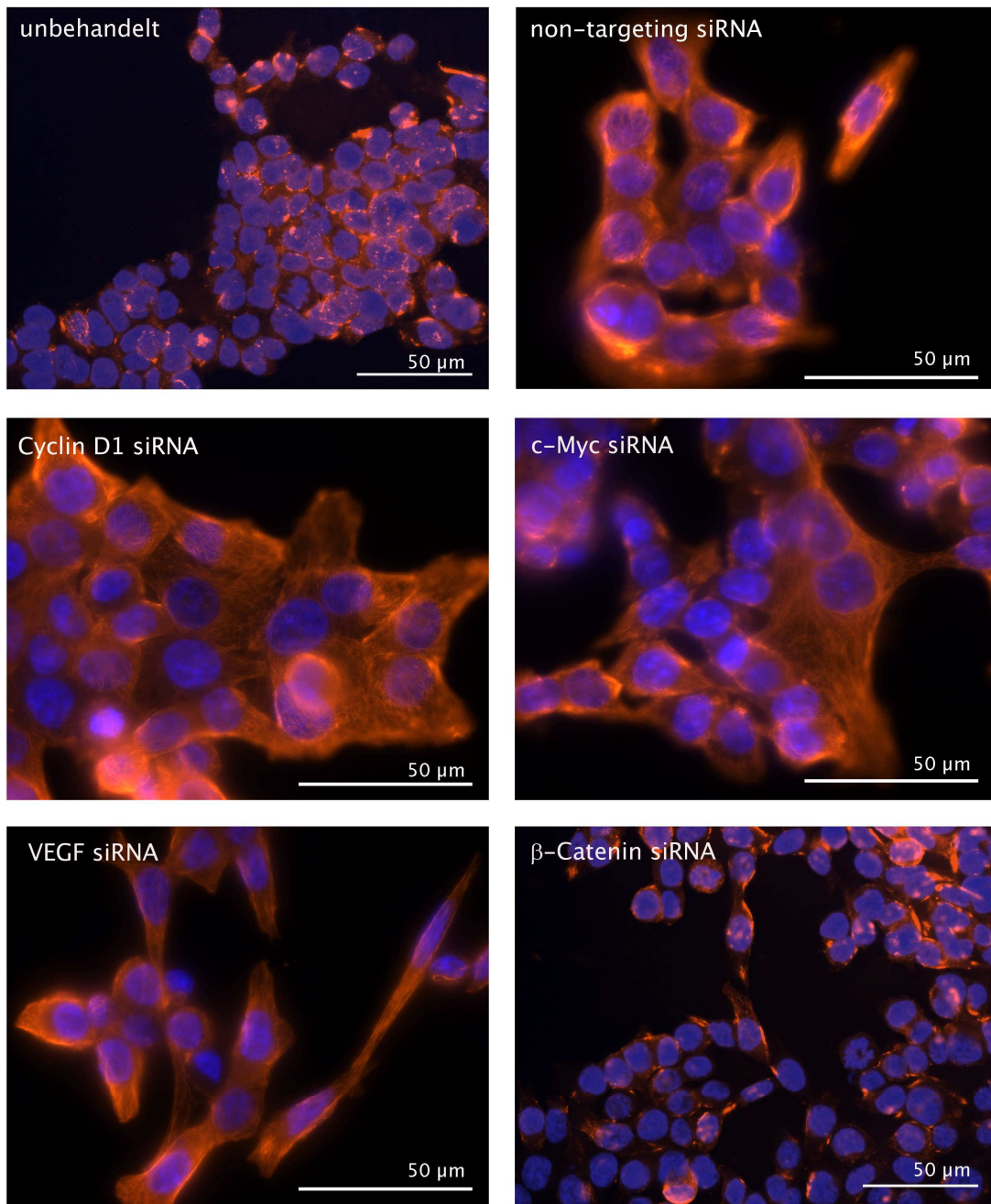
In HeLa Zellen (Abbildung 4.42) führte die Behandlung mit siRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer lang gestreckten Zellform.

#### **4.7.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Tubulin markierter Zellen**

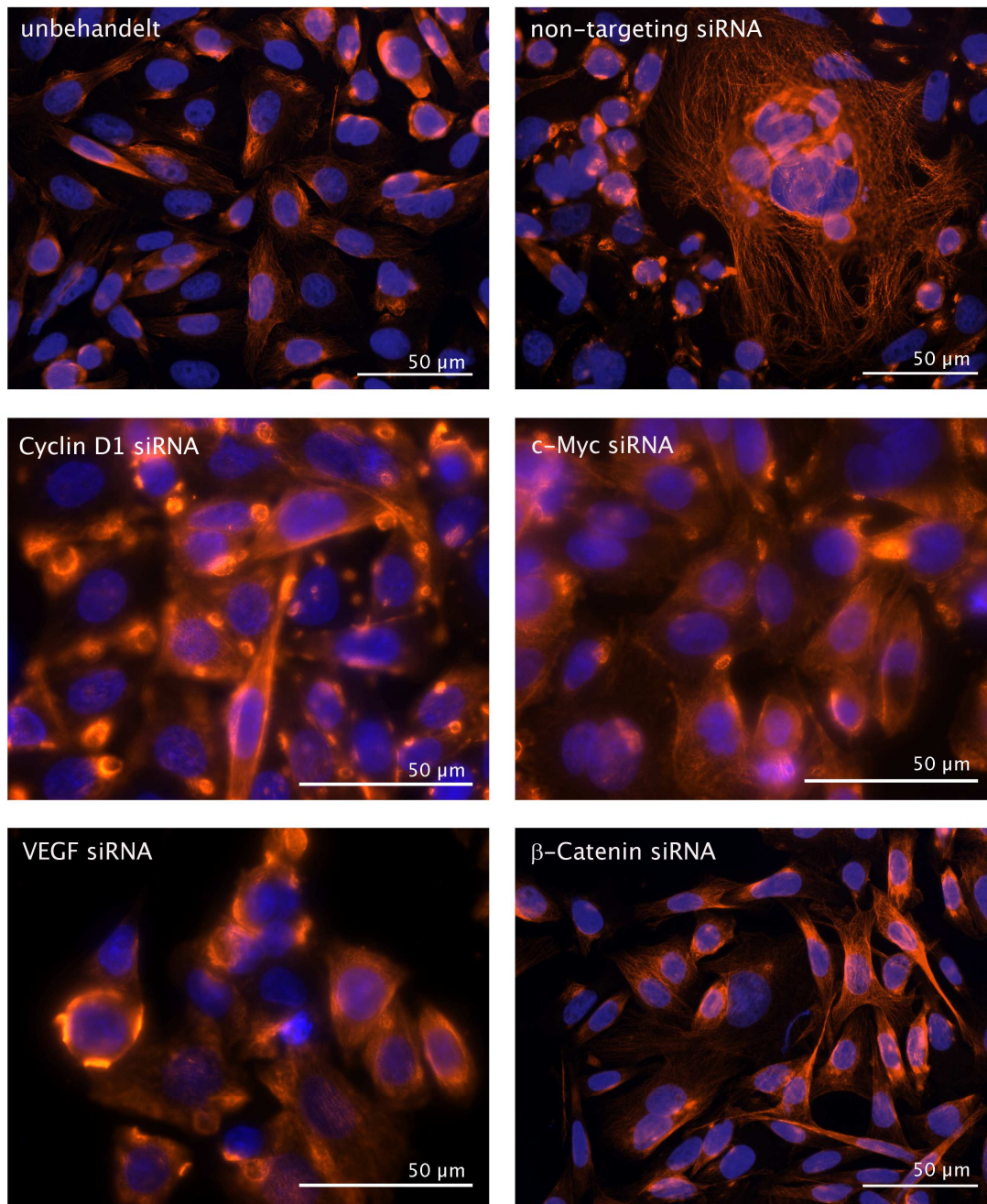
Abschließend wurde die Zellmorphologie mit Hilfe der Tubulin-Markierung untersucht. In der Zelle werden Mikrotubuli aus einzelnen Tubulin Untereinheiten gebildet. Diese röhrenförmigen Strukturen sind Bestandteil des Zytoskeletts und somit mitverantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle sowie ihrer äußeren Form. Darüber hinaus sind sie an Bewegungen der Zelle als ganzes und an Bewegungen und Transporten innerhalb der Zelle beteiligt. In den Abbildungen 4.43 bis 4.45 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Tubulin-Markierung in den verschiedenen Zelllinien dargestellt.

In HCT116 Zellen (Abbildung 4.43), die mit Cyclin D1 siRNA behandelt waren, erschienen die Mikrotubuli großflächig verbreitet. Die Transfektion von c-Myc siRNA hatte keine auffälligen Änderungen der Mikrotubulstruktur zur Folge. Nach Verwendung der VEGF siRNA waren HCT116 Zellen schmal und lang gestreckt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in  $\beta$ -Catenin siRNA behandelten HCT116 Zellen sowie in siRNA behandelten SW480 (Abbildung 4.44) und HeLa Zellen (Abbildung 4.45) keine Änderung im Vergleich zu den Kontrollzellen.

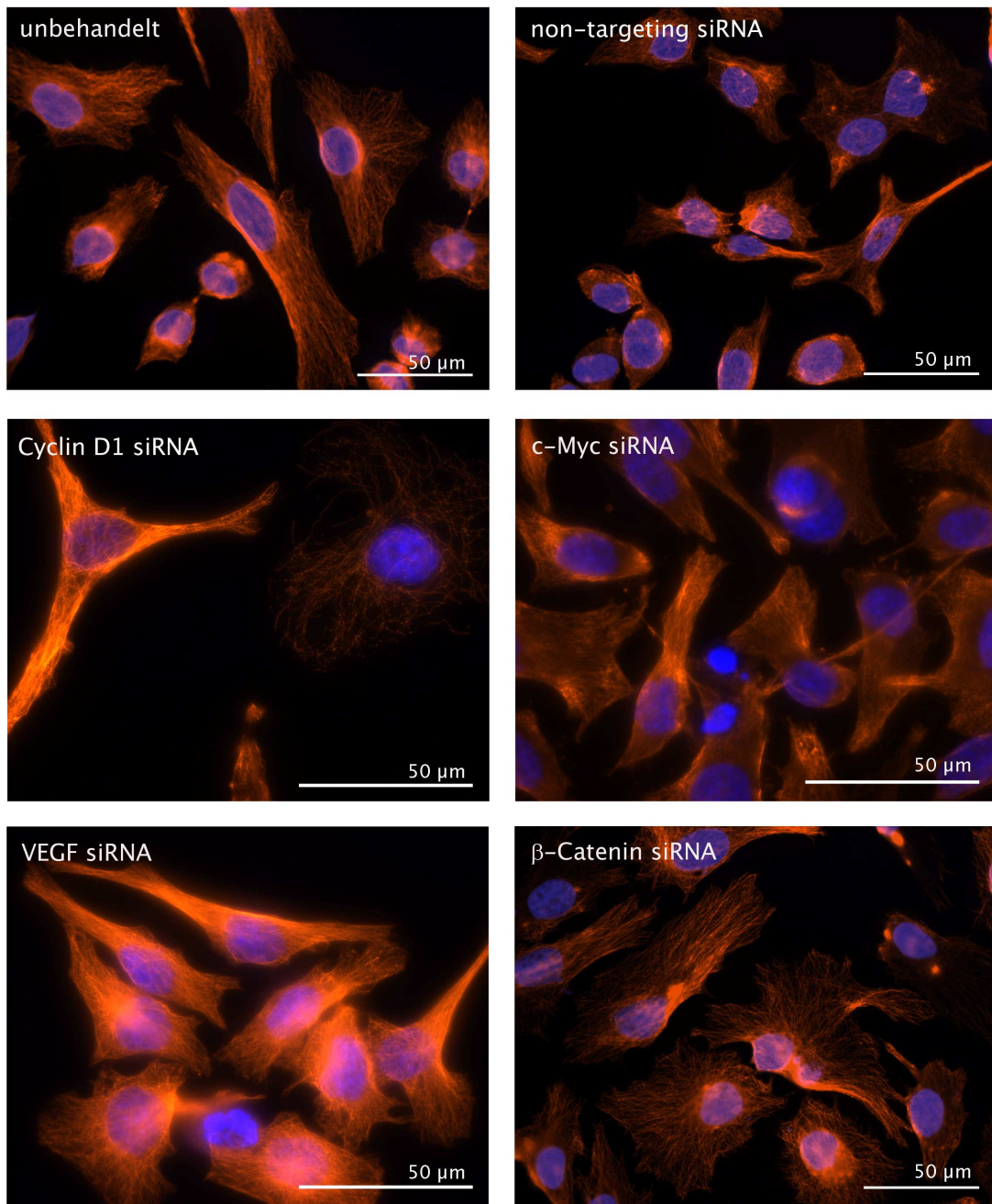




**Abb. 4.43: Mikrotubuli in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Tubulin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.44: Mikrotubuli in siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Tubulin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.45: Mikrotubuli in siRNA behandelten HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Tubulin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen beziehungsweise 63fachen Vergrößerung.

## 4.7.6 Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Zelladhäsion

Zur weiteren Bestimmung des Einflusses des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration von Tumorzellen wurde die Zelladhäsion untersucht. Dafür wurden HCT116, SW480 und HeLa Zellen nach Transfektion mit der betreffenden siRNA mit Hilfe einer E-Cadherin-Markierung beziehungsweise Vinculin-Phalloidin/FITC Komarkierung analysiert.

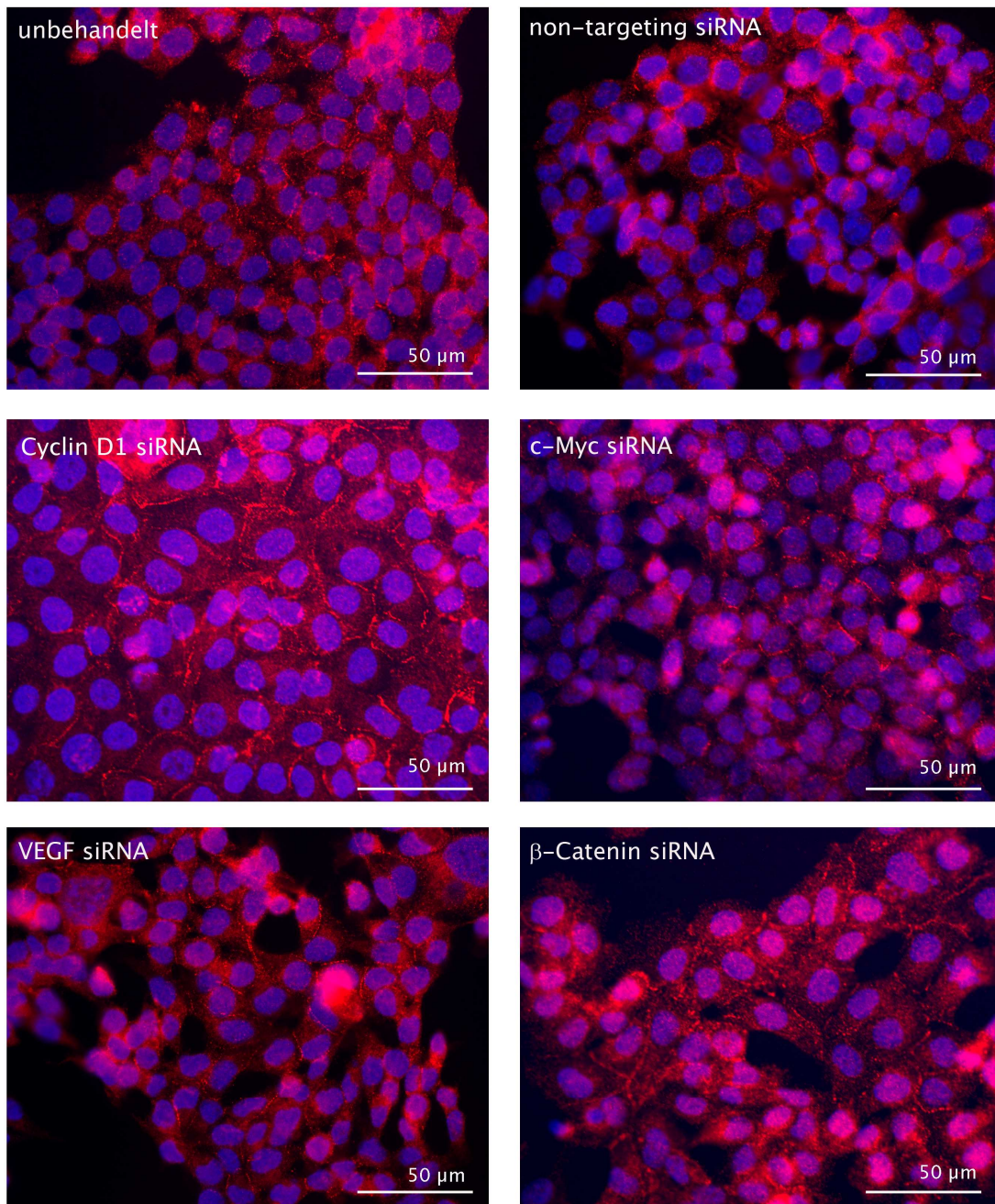
### 4.7.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen E-Cadherin markierter Zellen

E-Cadherin verknüpft Proteine der Adhärenzverbindungen mit dem Aktinzytoskelett (Brembeck *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sollte der Einfluss der ausgewählten Wnt Zielgene auf E-Cadherin untersucht werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der E-Cadherin-Markierung in den verschiedenen Zelllinien finden sich in den Abbildungen 4.46 bis 4.48.

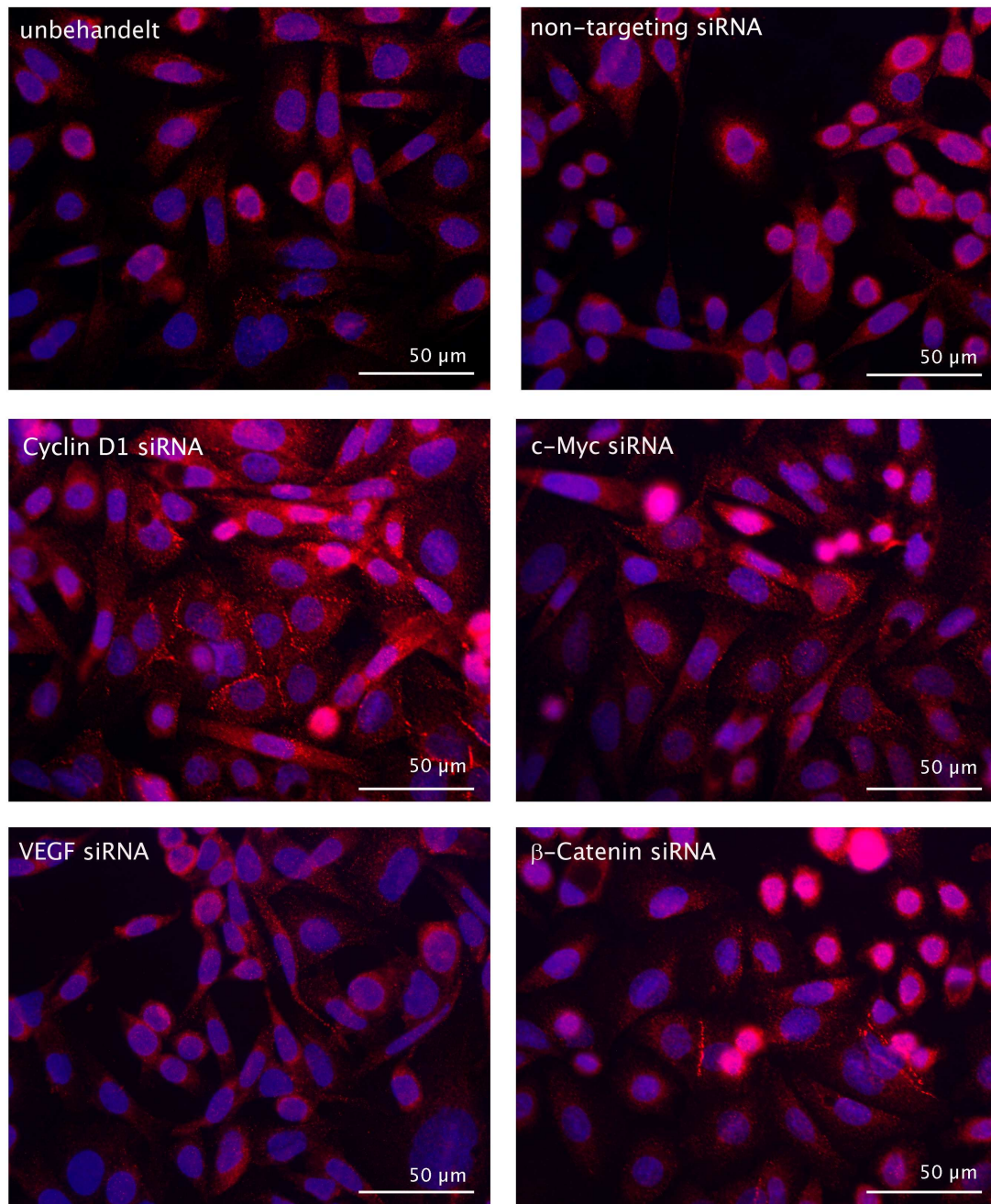
In unbehandelten und mit *non-targeting* siRNA transfizierten HCT116 Kontrollzellen (Abbildung 4.46) waren vereinzelt Zell-Zellverbindungen zu beobachten. Diese nahmen jedoch nach Behandlung der Zellen mit Cyclin D1 siRNA und  $\beta$ -Catenin siRNA deutlich zu. Dagegen zeigten weder c-Myc siRNA noch VEGF siRNA transfizierte Zellen eine Änderung der E-Cadherin-Markierung.

Unbehandelte sowie mit *non-targeting* siRNA behandelte SW480 Kontrollzellen (Abbildung 4.47) zeigten keine ausgeprägten Zell-Zellkontakte. Im Gegensatz dazu waren diese nach Transfektion von Cyclin D1 siRNA deutlich zu sehen. Auch durch die Verwendung von  $\beta$ -Catenin siRNA in SW480 Zellen konnte eine Zunahme der Adhärenzverbindungen beobachtet werden. Dagegen hatten weder die Transfektion von c-Myc siRNA noch von VEGF siRNA einen Einfluss auf die Ausbildung der Zell-Zellverbindungen.

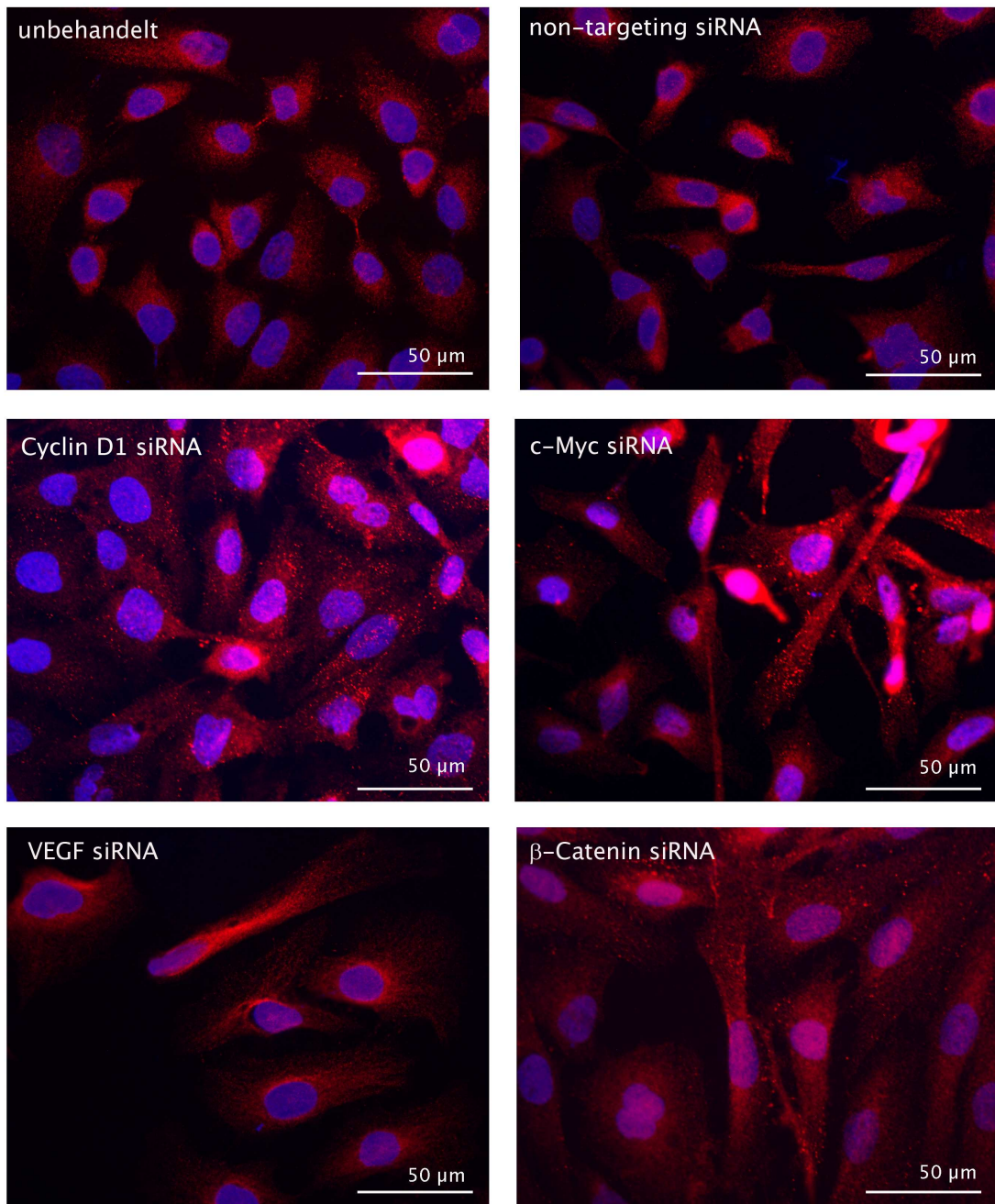
In HeLa Zellen (Abbildung 4.48) war nach siRNA Behandlung kein Effekt zu erkennen. Hier zeigten weder die behandelten noch die Kontrollzellen ausgeprägte Zell-Zellverbindungen.



**Abb. 4.46: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von E-Cadherin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.47: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von E-Cadherin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.48: E-Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen in siRNA behandelten HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von E-Cadherin (Cy3; rot) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Als Kontrolle dienten mit *non-targeting* siRNA behandelte Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.

#### 4.7.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Vinculin-Phalloidin/FITC komarkierter Zellen

Vinculin ist ein Aktin bindendes Protein, das homolog zu  $\alpha$ -Catenin ist (Pokutta & Weis, 2007). Es ist sowohl ein Marker für Integrin vermittelte Zell-Substrat Kontakte (Fokaladhäsionen) als auch für Cadherin vermittelte Zell-Zellverbindungen, in denen es vermutlich mit  $\beta$ -Catenin interagiert (Ziegler *et al.*, 2006). In beiden Fällen dient Vinculin dazu, F-Aktin an der Membran zu verankern. Obwohl die genaue Funktion von Vinculin noch ungeklärt ist, ist doch bekannt, dass eine Überexpression von Vinculin zu reduzierter Zellmigration führt, während eine Inaktivierung eine erhöhte Zellbewegung zur Folge hat (Ziegler *et al.*, 2006).

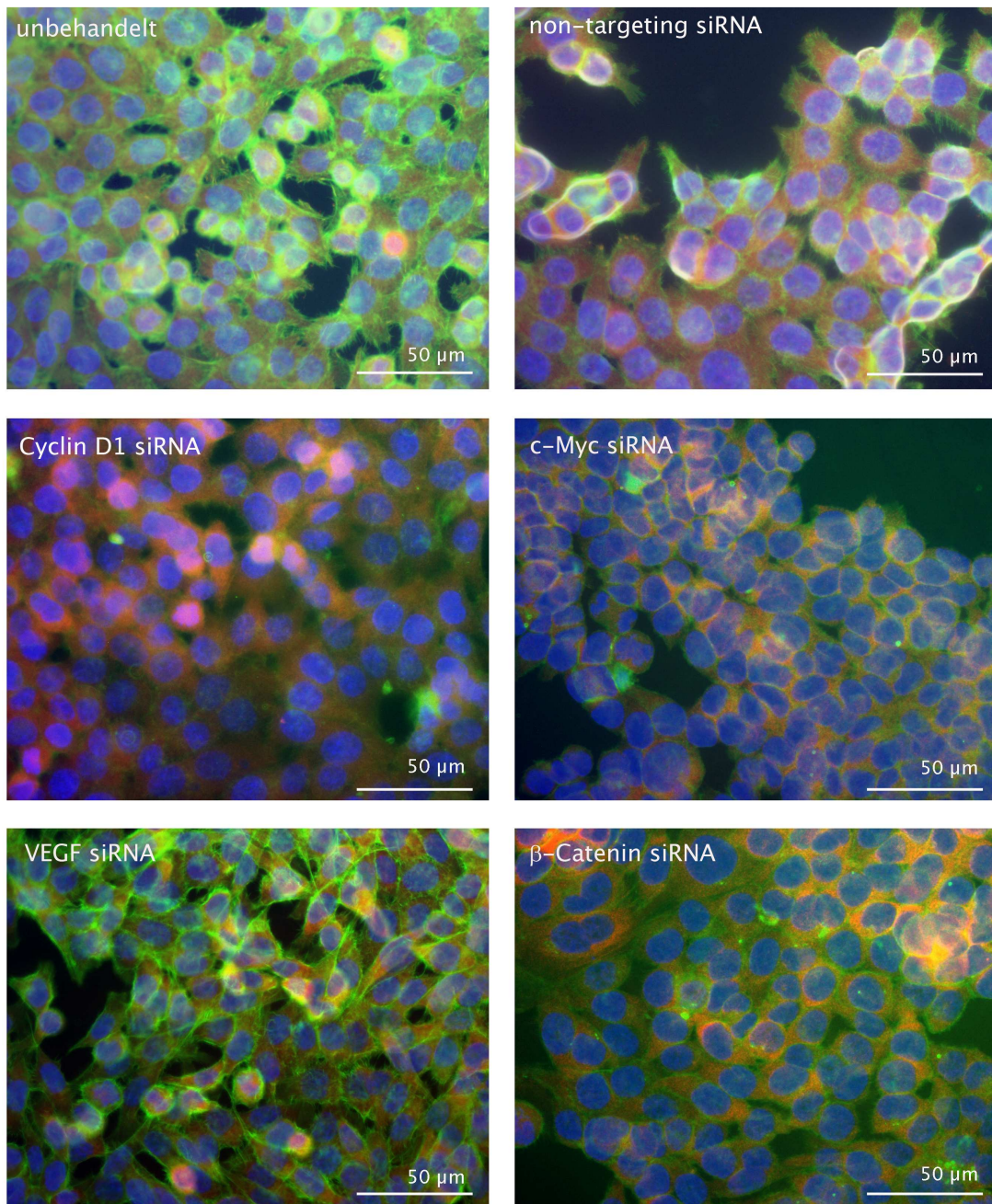
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Vinculin-Phalloidin/FITC Komarkierung in den verschiedenen Zelllinien finden sich in den Abbildungen 4.49 bis 4.51.

In HCT116 Zellen (Abbildung 4.49) war keine Änderung der Vinculin-Markierung in siRNA behandelten Zellen zu erkennen.

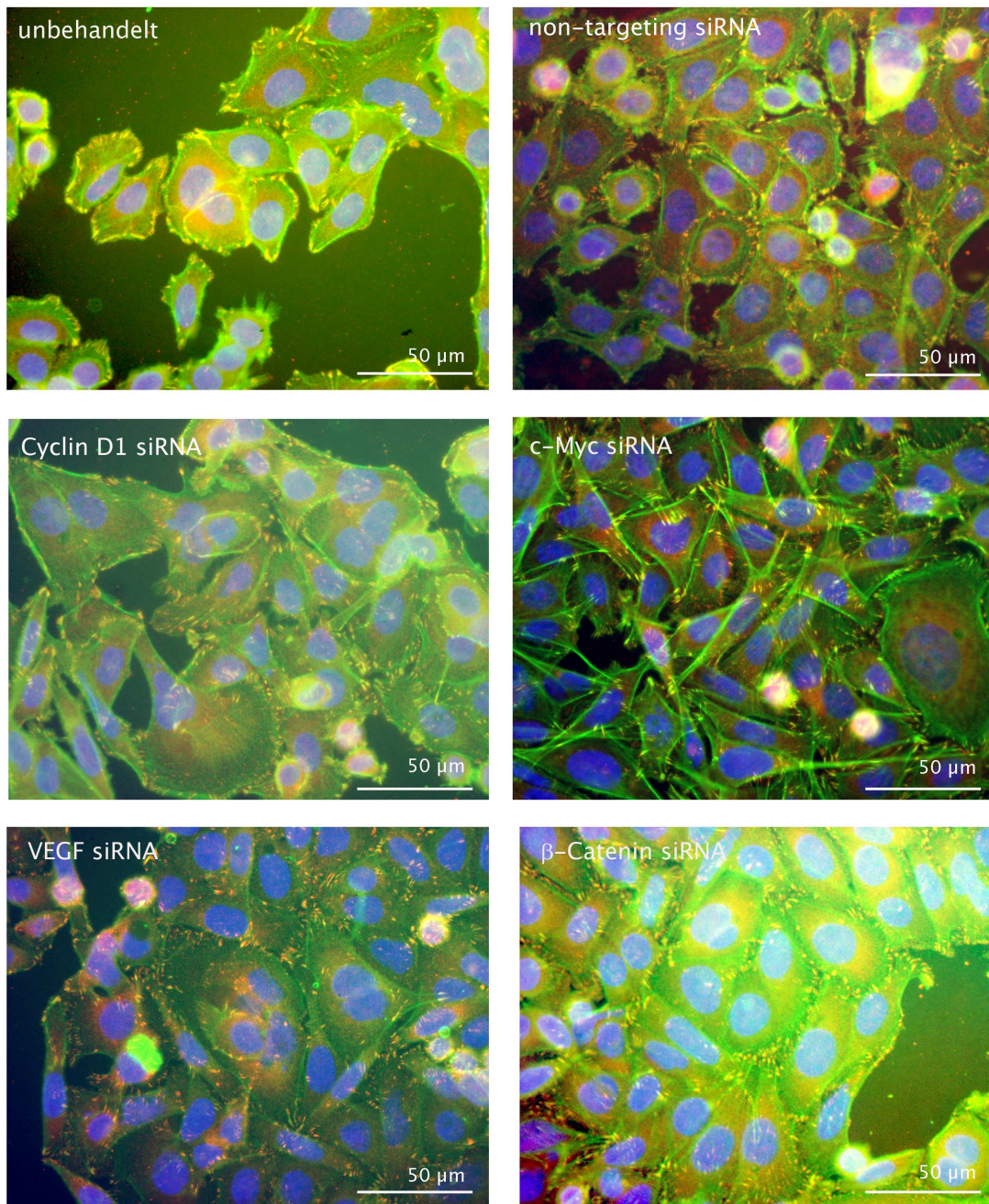
Mit Cyclin D1 siRNA behandelte SW480 Zellen (Abbildung 4.50) erschienen großflächig im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen zeigten eine leicht erhöhte Ausdehnung. In diesem Fall zeigten weder c-Myc siRNA noch VEGF siRNA behandelte Zellen eine Änderung zu den Kontrollzellen.

Mit c-Myc siRNA transfizierte HeLa Zellen (Abbildung 4.51) erschienen länglich im Vergleich zu den Kontrollzellen. Darüber hinaus war kein deutlicher Effekt für Cyclin D1 siRNA, VEGF siRNA oder  $\beta$ -Catenin siRNA transfizierte Zellen zu erkennen.

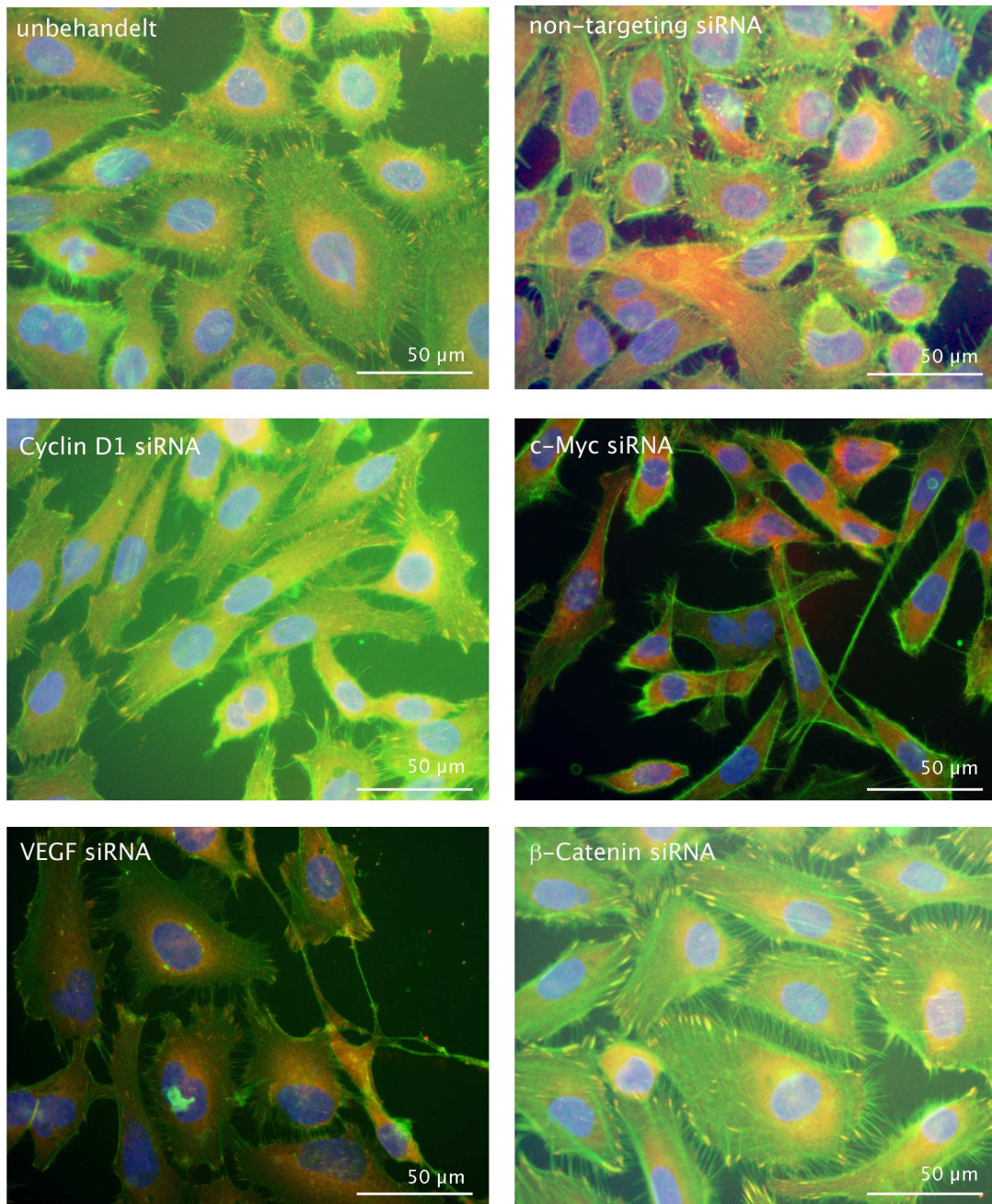




**Abb. 4.49: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten HCT116 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Vinculin (Cy3; rot) und Aktin (Phalloidin/FITC; grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.50: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten SW480 Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Vinculin (Cy3; rot) und Aktin (Phalloidin/FITC; grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.



**Abb. 4.51: Zell-Substrat Kontakte in siRNA behandelten HeLa Zellen.** Zu sehen ist die immunzytochemische Färbung von Vinculin (Cy3; rot) und Aktin (Phalloidin/FITC; grün) in unbehandelten sowie in siRNA behandelten Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer 40fachen Vergrößerung.

### 4.7.7 Zusammenfassung der Regulation der Zellmigration

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. In der ersten Tabelle (Tabelle 4.22) ist der Einfluss der jeweiligen siRNA auf Migration, Ausbildung von Zell-Zellkontakten und das Zellzytoskelett dargestellt.

**Tab. 4.22.: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf Migration und Adhäsion von Tumorzellen.** Zu sehen sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. — bezeichnet einen Rückgang, während + eine Erhöhung anzeigt. Im Fall der Zellmorphologie bedeutet + eine beobachtete Veränderung. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen. n.a.: nicht analysiert.

		<b>Migration</b>	<b>Aktin- zytoskelett</b>	<b>Zell- morphologie</b>	<b>Zell- Zellkontakte</b>
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	+	+	+
	SW480 Zellen	—	+	+	+
	HeLa Zellen	—	n.a.	○	○
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	+	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	+	+	○
	SW480 Zellen	+	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	+	○	+
	SW480 Zellen	○	○	○	+
	HeLa Zellen	—	n.a.	○	○

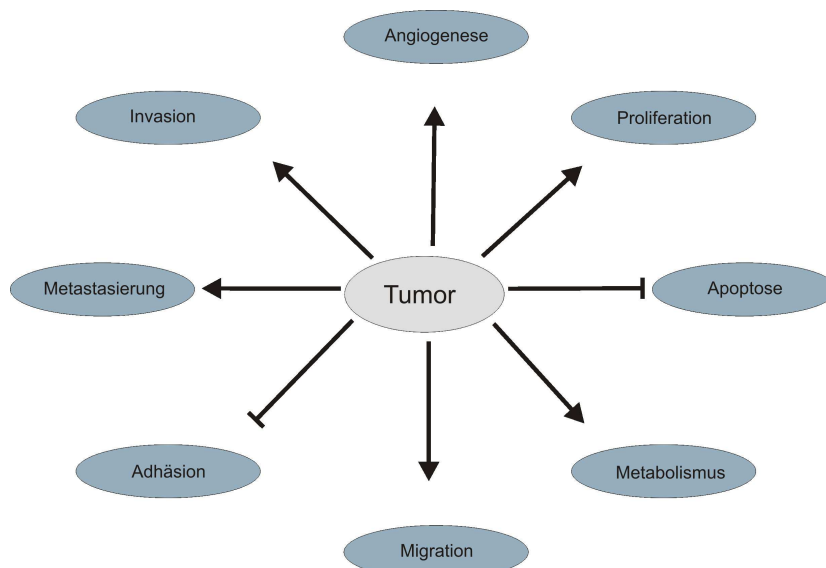
Die zweite Tabelle (Tabelle 4.23) zeigt die Regulation anti-migratorischer Gene durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene.

**Tab. 4.23: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription ausgewählter Migrationsinhibitoren in Tumorzellen.** Zu sehen sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. — bezeichnet einen Rückgang, während + eine Erhöhung anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. Als Referenz dienten jeweils mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrollzellen.

		<i>TSP1</i>	<i>ROCK2</i>
<b>Cyclin D1 siRNA</b>	HCT116 Zellen	—	—
	SW480 Zellen	○	—
	HeLa Zellen	○	○
<b>c-Myc siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	○
	SW480 Zellen	○	—
	HeLa Zellen	+	○
<b>VEGF siRNA</b>	HCT116 Zellen	+	+
	SW480 Zellen	—	—
	HeLa Zellen	○	○
<b>β-Catenin siRNA</b>	HCT116 Zellen	○	—
	SW480 Zellen	○	○
	HeLa Zellen	—	—

## 5. Diskussion

Die Krebsentstehung ist nach dem Modell von Hanahan und Weinberg (2000) ein mehrstufiger Prozess. Im Verlauf der Karzinogenese müssen Zellen unterschiedliche physiologische Veränderungen durchlaufen, um sich zu Tumorzellen zu entwickeln. Zu den charakteristischen Änderungen zählen unter anderem die Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen und ein potentiell unbegrenztes Vermehrungspotential sowie die Resistenz gegen wachstumshemmende und proapoptotische Signale. Dadurch wird das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod innerhalb eines Gewebes zugunsten der Zellteilung verschoben. Darüber hinaus können Tumorzellen Angiogenese induzieren, was für das Größenwachstum von Tumoren ab einem Durchmesser von ungefähr 100  $\mu\text{m}$  unerlässlich ist. Maligne Tumoren besitzen außerdem die Fähigkeit invasiv zu wachsen und Metastasen zu bilden. Dafür sind unter anderem Eigenschaften wie eine erhöhte Migration und verringerte Adhäsion der Zellen von Bedeutung. Ein weiteres Kennzeichen von Krebszellen ist ein veränderter Metabolismus, der den gesteigerten Energiebedarf der Zellen deckt. Ein Modell der charakteristischen Veränderungen von Tumorzellen ist in Abbildung 5.1 gezeigt.



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung charakteristischer Unterschiede zwischen Zellen eines Tumors und Normalzellen.** Die Tumorentwicklung ist nach dem Modell von Hanahan und Weinberg (2000) ein mehrstufiger Prozess. Während der Karzinogenese erlangen Tumorzellen beziehungsweise Tumoren einige charakteristische Eigenschaften, darunter erhöhte Proliferation, Inhibierung der Apoptose, veränderter Energiestoffwechsel, erhöhte Migration, verringerte Adhäsion und damit das Potential zur Invasion und Metastasierung. Darüber hinaus können Tumorzellen Angiogenese induzieren, was vor allem für das Größenwachstum der Tumoren von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit sollte die Rolle des Wnt Signalwegs und ausgewählter Zielgene in der Karzinogenese untersucht werden. Dafür wurden einige dieser Veränderungen analysiert, darunter Proliferation, Apoptose, Energiemetabolismus, Migration, Adhäsion und Morphologie von Kolonkarzinom- sowie Zervixkarzinomzellen.

## 5.1 *CCND1*, *c-MYC* und *VEGF* sind Zielgene des Wnt Signalwegs

Der kanonische Wnt Signalweg reguliert unterschiedliche Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose durch eine Vielzahl von Zielgenen. Eine abweichende Aktivierung des Signalwegs führt zur Tumorentstehung (Giles *et al.*, 2003). Als Modellsysteme dienten in dieser Arbeit die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480, in denen der Wnt Signalweg konstitutiv aktiv ist, und die Zervixkarzinomzelllinie HeLa, welche unter anderem aufgrund einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus-18 eine erhöhte Proliferationsrate aufweist. Der zelluläre Kontext entscheidet darüber, ob es sich bei einzelnen Genen um Zielgene des Wnt Signalwegs handelt (Clevers, 2006). Zu den wenigen universellen Zielgenen gehören bislang *Conductin/Axin2* (Jho *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002) und *SP5* (Weidinger *et al.*, 2005). Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob es sich bei *CCND1*, *c-MYC* und *VEGF* um Gene handelt, die in den gewählten Modellsystemen direkt durch den Wnt Signalweg reguliert werden. Hierzu wurde der Wnt Signalweg durch Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin, dem Schlüsselprotein dieses Signalwegs, mittels RNA Interferenz ausgeschaltet. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Auswirkung auf den jeweiligen mRNA Gehalt in den verschiedenen Zelllinien bestimmt. Untersucht wurden hierbei die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion der  $\beta$ -Catenin siRNA, um auch späte, indirekte Regulationsmechanismen zu erfassen. Eine Einteilung der Gene in primäre beziehungsweise sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs erfolgte unter den in der Einleitung in Abschnitt 1.3 und Abbildung 1.6 beschriebenen Kriterien. Die Ergebnisse der  $\beta$ -Catenin Inaktivierung und der Regulation der ausgewählten Gene sind im vorangegangenen Kapitel in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Wie dort beschrieben, konnte  $\beta$ -Catenin und damit der Wnt Signalweg mittels siRNA erfolgreich inaktiviert werden. Außerdem zeigen die Experimente, dass es sich bei *CCND1* und *c-MYC* in allen drei untersuchten Zelllinien um Zielgene des Wnt Signalwegs handelt. Der geringe Rückgang des Cyclin D1 mRNA Gehaltes in HCT116 Zellen könnte durch weitere

Regulationsmechanismen erklärt werden, wie zum Beispiel die Aktivierung der Transkription durch Ras (Albanese *et al.*, 1995), die zu einer Kompensierung der *CCND1* Transkription führen könnte. HCT116 Zellen weisen neben einem mutierten *CTNNB1* Gen die aktivierende *missense*-Mutation G13D im *KRAS* Gen auf, die außerdem in 55% der Fälle von HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) vorkommt (Fujiwara *et al.*, 1998). Mutationen im Ras Protein sind medizinisch von wichtiger Bedeutung, da etwa 30% aller humanen Tumoren eine Punktmutation in Kodon 12 und 61, seltener in Kodon 13, aufweisen (Bos, 1989). Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Ras Proteins und tragen somit zur erhöhten Zellproliferation und Tumorentwicklung bei (Seeburg *et al.*, 1984; Der *et al.*, 1986; Neri *et al.*, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass Ras die Transkription von *CCND1* durch CREB- (Tetsu & McCormick, 1999) und NF- $\kappa$ B Bindestellen im Promotor (Joyce *et al.*, 1999) erhöht.

Die geringe Senkung und späte (nach 72 Stunden) Normalisierung des c-Myc mRNA Gehaltes in SW480 Zellen deutet an, dass die Transkription von c-*MYC* in diesen Zellen nicht nur durch den Wnt Signalweg sondern ebenfalls durch andere Mechanismen reguliert wird. Für eine Auflistung alternativer Signalwege siehe Abschnitt 1.3.2 der Einleitung. Außerdem konnte *VEGF* in HCT116 und HeLa Zellen als Zielgen des Wnt Signalwegs bestätigt werden (Zhang *et al.*, 2001; Easwaran *et al.*, 2003). In SW480 Zellen hingegen zeigte sich nach 24 Stunden keine Regulation und nach 48 beziehungsweise 72 Stunden eine Erhöhung des VEGF mRNA Gehaltes. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei *VEGF* in SW480 Zellen um ein sekundär negativ reguliertes Gen handeln könnte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen stimmen teilweise mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. So wurde *CCND1* bereits in verschiedenen Systemen, darunter HCT116, SW480 und HeLa Zellen, als direktes Wnt Zielgen beschrieben (Tetsu & McCormick, 1999; Shtutman *et al.*, 1999; Willert *et al.*, 2002), wohingegen andere Studien dies nicht bestätigen konnten (van de Wetering *et al.*, 2002; Sansom *et al.*, 2004; Sansom *et al.*, 2005; Andreu *et al.*, 2005). Der Nachweis von c-*MYC* als Wnt Zielgen in HCT116 und SW480 Zellen ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von He *et al.* (1998). Außerdem konnte c-Myc bereits in normalen Krypten *in vivo* (van de Wetering *et al.*, 2002) sowie in intestinalen Epithelzellen nach Deletion des *APC* Gens (Sansom *et al.*, 2004) als Wnt Zielgen nachgewiesen werden. Aktuelle Studien, in denen im Dünndarm von Mäusen sowohl *APC* als auch c-*Myc* deletiert worden waren, zeigten, dass der Verlust von c-Myc den Phänotyp der *APC*<sup>-/-</sup> Mäuse (gestörte Differenzierung, Migration, Proliferation und Apoptose) rettete (Sansom *et al.*, 2007). Somit handelt es sich bei c-Myc in Darmzellen um



den Hauptvermittler in der Krebsentstehung nach *APC* Verlust. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *c-MYC* nicht nur in kolorektalen Karzinomzelllinien, sondern auch in HeLa Zellen durch den Wnt Signalweg reguliert wird. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle von *c-Myc* nicht nur im Kolonkarzinom sondern auch in anderen Krebserkrankungen hin. Des Weiteren konnte in HCT116 und HeLa Zellen *VEGF* als Wnt Zielgen bestätigt werden (Zhang *et al.*, 2001; Easwaran *et al.*, 2003). Der Nachweis, dass es sich bei *VEGF* in SW480 Zellen dagegen nicht um ein direkt reguliertes Zielgen des Wnt Signalwegs handelt, unterstreicht die Bedeutung des zellulären Kontext.

## 5.2 Die Inaktivierung der ausgewählten Wnt Zielgene

Um die zellulären Effekte, die durch die einzelnen Wnt Zielgene vermittelt werden, unabhängig voneinander zu untersuchen, sollten diese einzeln mittels RNA Interferenz reguliert werden. Der Erfolg der Inaktivierung wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene überprüft. Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 4 in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Inaktivierung der ausgewählten Zielgene Cyclin D1, *c-Myc* und *VEGF* konnte in allen untersuchten Zelllinien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Hierbei betrug die Inaktivierung des jeweiligen Zielgens auf mRNA- beziehungsweise Proteinebene in den meisten Fällen mindestens 50%. Trotz einer im Vergleich zu den anderen Experimenten geringen Senkung des *VEGF* mRNA Gehalts in HCT116 Zellen, zeigte sich ein signifikanter Rückgang der entsprechenden Proteinmenge. Somit ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung von *VEGF* erfolgreich war. Die hohen Standardabweichungen der Regulation von Cyclin D1 und *c-Myc* auf Proteinebene sind durch die Nachweismethode bedingt. Die Bestimmung der jeweiligen Proteinmenge mittels *Western Blot* und anschließender densitometrischer Auswertung kann nur begrenzt quantitativ genutzt werden. Laut Pitre *et al.* (2006) gibt es keine lineare Beziehung zwischen dem tatsächlichen Proteingehalt im *Western Blot* und der gemessenen Dichte dieser Bande. Das Problem kann nur durch einen mitgeführten Standard des jeweiligen Proteins umgangen werden. Dies war jedoch in dieser Arbeit nicht möglich.

### 5.3 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation von Tumorzellen

Zunächst wurde der Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation von Tumorzellen untersucht. Als Maß dienten hierbei die Veränderung der DNA Syntheserate, die Anzahl Ki-67 negativer Zellkerne sowie die Progression des Zellzyklus siRNA behandelter Zellen. Das nukleäre Protein Ki-67 wird in aktiv proliferierenden Zellen in allen Phasen des Zellzyklus synthetisiert. Eine Ausnahme stellt hierbei die G<sub>0</sub>-Phase dar, in der die Zellen pausieren. Somit ist die Anzahl Ki-67 negativer Zellen umgekehrt proportional zur Proliferationsrate einer Zellpopulation.

Die Untersuchung der DNA Syntheserate mittels BrdU-Markierung zeigte, dass in allen getesteten Tumorzelllinien die Behandlung mit Cyclin D1 siRNA zu einem Rückgang der DNA Synthese führte. Im Gegensatz dazu war in HeLa Zellen nach Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA sowie der c-Myc siRNA und VEGF siRNA eine Senkung zu verzeichnen. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wiederum zeigte eine Erhöhung der Anzahl Ki-67 negativer Zellkerne in Cyclin D1 siRNA- und c-Myc siRNA behandelten Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480, wohingegen in HeLa Zellen keine Änderung beobachtet wurde. Des Weiteren wurde das Fortschreiten des Zellzyklus in Kolonkarzinomzellen mittels Propidiumiodid-Markierung in der Durchflusszytometrie untersucht. Wurde der Cyclin D1- beziehungsweise c-Myc Gehalt der Zellen mit Hilfe von RNA Interferenz gesenkt, befand sich ein höherer Anteil der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, wohingegen weniger Zellen in der S- und G<sub>2</sub>/M-Phase zu finden waren.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 5.1 abstrahiert dargestellt (vergleiche Tabelle 4.9). Während die Tabellen in Kapitel 4 die direkten experimentell gefundenen Zusammenhänge zeigen, sind innerhalb der Diskussion die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen dargestellt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Cyclin D1 notwendig ist für die DNA Syntheserate in Tumorzellen. Der Wnt Signalweg beeinflusst die DNA Synthese durch seine Zielgene zellkontextspezifisch. Des Weiteren wird in Kolonkarzinomzellen die Proliferation maßgeblich durch Cyclin D1 und c-Myc reguliert. Hierbei ist vor allem der Eintritt in einen aktiven Zellzyklus sowie die G<sub>1</sub>/S Transition betroffen. Im Gegensatz dazu beeinflussen der Wnt Signalweg und die untersuchten Zielgene in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa zwar die DNA Synthese, haben aber keinen nachweisbaren Effekt auf die Progression des Zellzyklus.

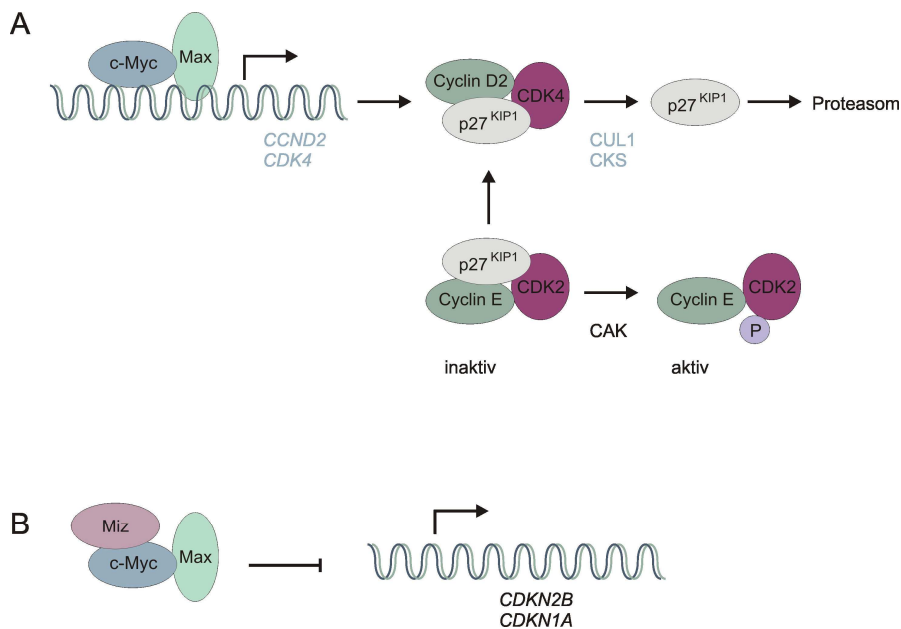
**Tab. 5.1: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation von Tumorzellen.** Zu sehen ist die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die untersuchten Parameter in den verschiedenen Zelllinien. — bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. n.a.: nicht analysiert.

		DNA Syntheserate	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> Übergang	Zellzyklus- progression
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	+	+	+
	SW480 Zellen	+	+	+
	HeLa Zellen	+	○	n.a.
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	○	+	+
	SW480 Zellen	○	+	+
	HeLa Zellen	+	○	n.a.
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	○	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○
	HeLa Zellen	+	○	n.a.
<b>β-Catenin</b>	HCT116 Zellen	○	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○
	HeLa Zellen	+	○	n.a.

Die Ergebnisse für Cyclin D1 sind in Übereinstimmung mit anderen Studien, die zeigen konnten, dass Cyclin D1 wichtig ist für das Fortschreiten der G<sub>1</sub>-Phase, da es CDK4 und CDK6 im Zellzyklus aktiviert und so die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb) reguliert (Matsushime *et al.*, 1991; Motokura *et al.*, 1991; Xiong *et al.*, 1991). Diese initiale Phosphorylierung durch Cyclin D1/CDK4 und Cyclin D1/CDK6 ermöglicht weitere Phosphorylierungen durch Cyclin E/CDK2 Komplexe (Harbour *et al.*, 1999). Dies hat zur Folge, dass nun hyperphosphoryliertes Rb nicht länger an E2F Transkriptionsfaktoren binden und diese inhibieren kann, so dass Gene der S-Phase aktiviert werden können (Flemington *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993). Auf diese Weise kann Rb als zentrale Komponente eines Repressionskomplexes die Transkription vieler Gene inhibieren, deren Produkte für den Übergang der G<sub>1</sub> in die S-Phase sowie für die S-Phase selbst notwendig sind (Harbour & Dean, 2000).

Für c-Myc ist ebenfalls bekannt, dass es die Zellproliferation fördert (Eilers *et al.*, 1991) und die Zelldifferenzierung inhibiert (Freytag & Geddes, 1992), indem es die Progression des Zellzyklus kontrolliert (Nesbit *et al.*, 1999; Eilers, 1999; Amati, 2001). Den Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase reguliert c-Myc durch Aktivierung und Reprimierung seiner Zielgene. Ein Modell dieser Regulation ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Beispielsweise induziert c-Myc früh in der G<sub>1</sub>-Phase die Aktivität der Cyclin E/CDK2 Komplexe (Steiner *et al.*, 1995;

Berns *et al.*, 1997), indem es die Transkription von *CCND2* (kodiert Cyclin D2) und *CDK4* aktiviert (Coller *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Hermeking *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 5.2A). Dies hat zur Folge, dass der Inhibitor  $p27^{Kip1}$  von Cyclin D2/CDK4 Komplexen gebunden wird und so nicht mehr mit Cyclin E/CDK2 interagieren und diesen Komplex inhibieren kann (Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999). In der anschließenden Degradation von  $p27^{Kip1}$  sind zwei weitere c-Myc Zielgene involviert, *CUL-1* (*cullin-1*) und *CKS* (*CDC28 protein kinase regulatory subunit*) (Coller *et al.*, 2000; O'Hagan *et al.*, 2000a). Weiterhin fördert c-Myc die Progression des Zellzyklus durch Reprimierung der CDK Inhibitoren  $p15^{INK4B}$  und  $p21$ , die im Zellzyklusarrest eine große Rolle spielen (Abbildung 5.2B).



**Abb. 5.2: c-Myc fördert die Zellzyklusprogression durch Genaktivierung und -reprimierung** (modifiziert nach Pelengaris *et al.*, 2003). (A) Myc/Max Heterodimere aktivieren Zielgene wie zum Beispiel *CCND2* (kodiert Cyclin D2) und *CDK4*, deren Produkte  $p27^{Kip1}$  binden. An der anschließenden proteasomalen Degradation sind weitere c-Myc Zielgene beteiligt, *CUL-1* (*cullin-1*) und *CKS* (*CDC28 protein kinase regulatory subunit*). Dies hat zur Folge, dass  $p27^{Kip1}$  nicht länger zur Verfügung steht und so nicht mehr an den Cyclin E/CDK2 Komplex binden und diesen inhibieren kann. Somit wird Cyclin E/CDK2 durch CAK (*cyclin activating kinase*) phosphoryliert und aktiviert. (B) Durch die Interaktion des Myc/Max Heterodimers mit Miz1 (und/oder Sp-1) wirkt der Komplex als transkriptionaler Repressor und verhindert so die Transkription der CDK Inhibitoren *CDKN2B* (kodiert  $p15^{INK4B}$ ) und *CDKN1A* (kodiert  $p21$ ).

Um den Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Zellproliferation näher zu charakterisieren, wurde die Transkription von *CDKN1A*, *TP53* und *TFRC* als Teil der Wnt Antwort in Tumorzellen untersucht. Das Protein  $p21$  bewirkt durch Inhibierung des Cyclin

E/CDK2 Komplexes einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase. Der Cyclin E/CDK2 Komplex ist in die Phosphorylierung von Rb involviert und spielt somit eine wichtige Rolle für das Fortschreiten des Zellzyklus. Außerdem kann p21 mit dem Replikationshilfsprotein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) interagieren, wodurch die DNA-Replikation mit der DNA-Polymerase  $\delta$  gehemmt wird (Sherr & Roberts, 1999). Des Weiteren kann p21 während der Apoptose und Differenzierung eine modulatorische Funktion ausüben (Dotto, 2003; van de Wetering *et al.*, 2002). Die Aktivierung von p53, zum Beispiel durch DNA Schädigung, hat ebenfalls einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase zur Folge. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Funktionen vermittelt, indem er eine große Anzahl an Zielgenen aktiviert oder reprimiert (Zhao *et al.*, 2000; Vogelstein *et al.*, 2000; Mirza *et al.*, 2003; Polyak *et al.*, 1997). Zu den Zielgenen, die positiv reguliert werden, zählt unter anderem *CDKN1A*. Darüber hinaus ist *TP53* eines der häufigsten mutierten Gene in humanen Tumoren (Levine *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991). Zuletzt wurde die Transkription von *TFRC* untersucht, eines bekannten c-Myc Zielgens (O'Donnell *et al.*, 2006). Der Transferrin Rezeptor (TfR) reguliert in der Zelle die Aufnahme von Eisen gebundenem Transferrin durch Rezeptor vermittelte Endozytose (Cheng *et al.*, 2004). Die Menge der TfR Moleküle auf der Zelloberfläche korreliert mit der Proliferationsrate einer Zelle, so dass in Krebszellen häufig eine erhöhte *TFRC* Expression detektiert wird (Gatter *et al.*, 1983; Richardson, 2002; Daniels *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der Regulation dieser Gene durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene ist in Tabelle 5.2 vereinfacht dargestellt (vergleiche Tabelle 4.10).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass *CDKN1A* in HCT116 und HeLa Zellen durch die primären Wnt Zielgene Cyclin D1, c-Myc und VEGF negativ reguliert wird, während in SW480 Zellen die Transkription durch Cyclin D1 und VEGF aktiviert wird. Die negative Regulation von *CDKN1A* durch c-Myc konnte somit in HCT116 und HeLa Zellen bestätigt werden (Abbildung 5.2B) (Gartel *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Staller *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005). Die Ergebnisse zeigen damit, dass es sich bei *CDKN1A* um ein zellkontextabhängig negativ reguliertes sekundäres Wnt Zielgen handelt. Die Regulation kann hierbei sowohl durch c-Myc erfolgen (Gartel *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Staller *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005) als auch durch andere Wnt Zielgene wie Cyclin D1 und VEGF. Des Weiteren konnte die negative Regulation von *CDKN1A* als primäres Wnt Zielgen in HeLa Zellen durch Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA bestätigt werden (Kamei *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird *CDKN1A* in HCT116 Zellen primär positiv reguliert, obwohl es sich in dieser Zelllinie um ein sekundär negativ reguliertes Gen handelt. Dies lässt

sich durch die Untersuchung des p53 mRNA Gehaltes erklären. Im Gegensatz zum Wnt Signalweg und seinen Zielgenen aktiviert das Tumorsuppressorprotein p53 die Transkription von *CDKN1A*. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es sich bei *TP53* in HCT116 Zellen um ein primäres Wnt Zielgen handelt. Die Erhöhung der p53 mRNA Menge in dieser Zelllinie durch den Wnt Signalweg führt zu einer vermehrten Transkription von *CDKN1A*, so dass der sekundären negativen Regulation eine primäre Aktivierung voraus geht. Im Gegensatz dazu wird in HCT116 Zellen *TP53* wiederum sekundär negativ durch die Zielgene Cyclin D1 und VEGF reguliert. Dies bedeutet, dass die negative Regulation von *CDKN1A* durch Cyclin D1 und VEGF in HCT116 Zellen die Folge der inhibierten Transkription von *TP53* sein könnte.

Weiterhin konnte *TFRC* in allen Tumorzellen als c-Myc Zielgen bestätigt werden (O'Donnell *et al.*, 2006). Dagegen wird *TFRC* zellkontextabhängig durch andere primäre Zielgene aktiviert (Cyclin D1 in HCT116 Zellen) oder inhibiert (Cyclin D1 in HeLa- und VEGF in HCT116 Zellen), beziehungsweise nicht reguliert.

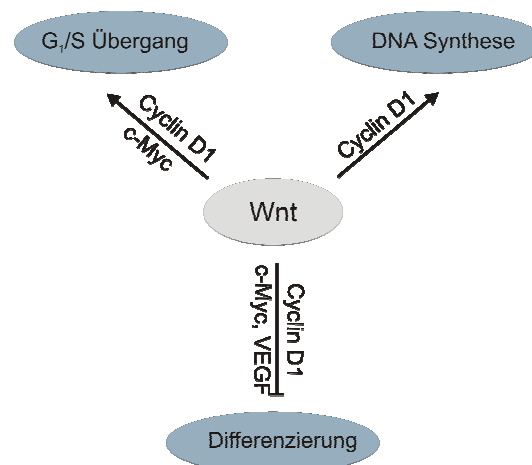
**Tab. 5.2: Untersuchung von *CDKN1A*, *TP53* und *TFRC* als primäre und sekundäre Zielgene des Wnt Signalwegs in Tumorzellen.** Zu sehen ist eine Darstellung der Regulation der Gene durch den Wnt Signalweg und seine Zielgene. — bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Das Zeichen o bedeutet keine Änderung. n.a.: nicht analysiert.

		<i>CDKN1A</i>	<i>TP53</i>	<i>TFRC</i>
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	—	—	+
	SW480 Zellen	+	o	o
	HeLa Zellen	—	o	—
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	—	o	+
	SW480 Zellen	o	o	+
	HeLa Zellen	—	o	+
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	—	—	—
	SW480 Zellen	+	o	o
	HeLa Zellen	—	o	o
<b><math>\beta</math>-Catenin</b>	HCT116 Zellen	+	+	n.a.
	SW480 Zellen	o	o	n.a.
	HeLa Zellen	—	o	n.a.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Wnt Signalweg die Proliferation von Tumorzellen über weitere primäre beziehungsweise sekundäre Zielgene reguliert. Die Regulation von *CDKN1A* durch Cyclin D1, c-Myc und VEGF ist ein Hinweis auf die Beteiligung dieser Wnt Zielgene an der Differenzierung. van de Wetering *et al.* (2002)

konnten zeigen, dass Proliferation und Differenzierung in intestinalen Zellen eng miteinander verbunden sind. Der Wnt Signalweg reguliert diese Prozesse in Kolonkarzinomzellen durch Kontrolle von p21, das einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase und Differenzierung vermittelt. Im Fall von Cyclin D1 und VEGF könnte der Einfluss auf die Transkription von *CDKN1A* zellkontextabhängig ebenfalls eine Folge der negativen Regulation von *TP53* sein. Außerdem wurde erstmalig gezeigt, dass es sich bei *TP53* in HCT116 Zellen um ein primäres Wnt Zielgen handelt. Die positive Regulation von *TFRC* durch c-Myc ist ebenfalls ein Hinweis auf die Bedeutung dieses Wnt Zielgens an der erhöhten Proliferationsrate von Tumorzellen.

Aufgrund der verschiedenen Untersuchungen der Zellzyklusprogression kann für den Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Proliferation das in Abbildung 5.3 gezeigte Modell erstellt werden.



**Abb. 5.3: Regulation der Proliferation in Tumorzellen durch den Wnt Signalweg.** Das Modell zeigt, welche Zielgene des Wnt Signalwegs in die verschiedenen Prozesse der Zellproliferation involviert sind. So sind Cyclin D1 und c-Myc notwendig für die Zellzyklusprogression, während alle untersuchten Zielgene eine Rolle in der Inhibierung der Differenzierung spielen.

## 5.4 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen

Als nächstes wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen untersucht. Dazu wurden in siRNA behandelten Zellen die Apoptoserate, der Anteil spät-apoptotischer beziehungsweise nekrotischer Zellen sowie die Lebensfähigkeit bestimmt. Tabelle 5.3 zeigt einen Überblick über die Wirkung der Wnt Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Krebszellen (vergleiche Tabelle 4.14).

**Tab. 5.3: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.** Zu sehen ist die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die untersuchten Parameter in den verschiedenen Zelllinien. — bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. n.a.: nicht analysiert.

		<b>Apoptose</b>	<b>Anteil spät-apoptotischer Zellen</b>	<b>Anteil nekrotischer Zellen</b>	<b>Lebensfähigkeit</b>
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	+	○	○	○
	SW480 Zellen	+	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	+	○	○	○
	SW480 Zellen	+	○	○	○
	HeLa Zellen	+	n.a.	○	○
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	—	—	○	+
	SW480 Zellen	○	○	○	○
	HeLa Zellen	+	n.a.	○	+
<b>β-Catenin</b>	HCT116 Zellen	n.a.	○	n.a.	○
	SW480 Zellen	n.a.	○	n.a.	○
	HeLa Zellen	n.a.	n.a.	n.a.	○

Die Untersuchung der siRNA behandelten Zellen mit Hilfe des Caspase-3/7 *Assays* zeigte, dass die Verwendung von Cyclin D1 siRNA und c-Myc siRNA zu einem Rückgang der Apoptoserate führte. Allerdings war dies für Cyclin D1 siRNA transfizierte Zellen lediglich in den Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480, nicht jedoch in HeLa Zellen der Fall. Darüber hinaus war keine Wirkung auf den Anteil spät-apoptotischer beziehungsweise nekrotischer Zellen oder auf die Lebensfähigkeit festzustellen.

Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass Cyclin D1 in Kolonkarzinomzellen eine proapoptotische Wirkung aufweist, während es in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa keinen Einfluss hat. Darüber hinaus zeigte sich in keiner der untersuchten Zelllinien eine Änderung im Anteil spät-apoptotischer beziehungsweise nekrotischer Zellen oder in der Lebensfähigkeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in dem verwendeten zellbasierten *Assay* zur Bestimmung der Apoptoserate die Aktivität der Caspasen 3 und 7 und somit der Anteil der Zellen bestimmt wurde, die sich in der mittleren Apoptosephase befanden. Der Anteil spät-apoptotischer Zellen kann mit Hilfe dieses Verfahrens nicht bestimmt werden. Es ist bekannt, dass die Apoptose eng mit der Kontrolle der Zellzyklusprogression verknüpft ist. Während des Übergangs der Zellen von der G<sub>1</sub> in die S-Phase können mehrere Faktoren den Vorgang der Apoptose auslösen, darunter das Tumorsuppressorprotein p53 und die CDK



Inhibitoren p21 und p27<sup>Kip1</sup> (Han *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von Cyclin D1 an der Apoptose nachgewiesen werden (Han *et al.*, 1996; Kraneburg *et al.*, 1996; Sofer-Levi & Resnitzky, 1996). Eine frühe Entdeckung der Involvierung von Cyclin D1 in diesen Prozess kam dabei von Studien an sterbenden Neuronen (Freeman *et al.*, 1994). Diese zeigten, dass eine erhöhte Apoptoserate mit einem erhöhten Cyclin D1 Gehalt der Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene korreliert. Die Cyclin D1 induzierte Apoptose kann dabei sowohl p53 abhängig als auch unabhängig erfolgen (Han *et al.*, 1999). Weitere Hinweise auf eine proapoptische Wirkung von Cyclin D1 kamen durch anschließende Studien, die zeigten, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F1, welche durch Cyclin D1 gefördert wird, bestimmt, ob Zellen in den Zellzyklusarrest eintreten oder in die Apoptose (La Thangue, 2003; Bell & Ryan, 2004; Dyson, 1998). Dagegen gibt es andere Untersuchungen, die eine antiapoptische Wirkung von Cyclin D1 in Lymphomzellen feststellten (Lahti *et al.*, 1997). Diese Entdeckungen unterstreichen die Bedeutung des zellulären Kontextes in verschiedenen Prozessen, darunter der Apoptose.

Auffallend ist, dass c-Myc in allen untersuchten Tumorzelllinien proapoptisch wirkte. Allerdings war auch hier kein Einfluss auf den Anteil spät-apoptischer beziehungsweise nekrotischer Zellen oder auf die Lebensfähigkeit festzustellen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die einen Zusammenhang zwischen c-Myc und der Erhöhung der Apoptoserate nachweisen konnten (Evan *et al.*, 1992; Askew *et al.*, 1991; Debbas & White, 1993). Der proapoptische Effekt des Onkoproteins könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Eintritt in den Zellzyklus die Zellen für Apoptose sensibilisiert. Wie bereits erwähnt, sind Zellproliferation und Apoptose gekoppelt und der apoptotische Signalweg wird solange unterdrückt wie geeignete Überlebensfaktoren antiapoptische Signale bereitstellen (Pelengaris & Khan, 2003). Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert nach denen c-Myc Apoptose auslösen kann. Zum einen kann c-Myc die Expression von p19<sup>ARF</sup> induzieren, was zu einer Stabilisierung von p53 führt (Zindy *et al.*, 1998). Das Tumorsuppressorprotein p53 wiederum aktiviert die Transkription des proapoptischen Faktors Bax (*Bcl-2-associated X protein*) (Pelengaris & Khan, 2003). Wie die Aktivierung von p19<sup>ARF</sup> stattfindet ist bislang unklar, jedoch scheint es kein direktes c-Myc Zielgen zu sein. Zum anderen fördert c-Myc die Freisetzung von Cytochrom c durch Mitochondrien unabhängig von p19<sup>ARF</sup> und p53 (Juin *et al.*, 1999). Die Freisetzung von Cytochrom c ist wichtig für die Oligomerisierung und Funktion von Bax (Soucie *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2000). Dieser Prozess wird zum Teil durch das Protein Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) vermittelt, das durch c-Myc induziert wird (Egle *et al.*, 2004). Allerdings ist auch

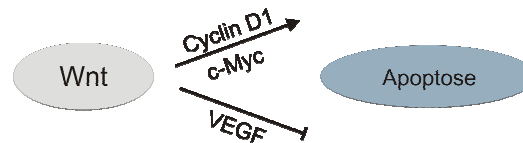
hier die Aktivierung nicht direkt, sondern erfolgt vermutlich durch Reprimierung der antiapoptotischen Faktoren Bcl-x<sub>L</sub> (*Basal cell lymphoma-extra large*) und Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Eischen *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Behandlung der HCT116 Zellen mit VEGF siRNA im Caspase-3/7 Assay zu einer erhöhten Apoptoserate führte. Hier war ebenfalls ein erhöhter Anteil spät-apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie zu verzeichnen sowie ein Rückgang der Lebensfähigkeit im MTT Assay. Die Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen zeigte dagegen keine Änderung. Nach der Transfektion von SW480 Zellen mit VEGF siRNA wurde in keiner der Untersuchungen eine Wirkung beobachtet, wohingegen in HeLa Zellen ein geringer Effekt auf die Apoptoserate und die Lebensfähigkeit zu verzeichnen war.

Die Wirkung von VEGF auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen ist vom zellulären Kontext bestimmt. So hat es in HCT116 Zellen einen antiapoptotischen Effekt, der sich ebenfalls im niedrigen Anteil spät-apoptotischer Zellen wiederfindet. Dieser positive Einfluss auf die Vitalität von Tumorzellen zeigt sich zudem in einer gesteigerten Lebensfähigkeit. Somit ist VEGF in HCT116 Zellen maßgeblich an der Umgehung der Apoptose und dem Erhalt der Lebensfähigkeit beteiligt. Frühere Studien konnten bereits den antiapoptotischen Einfluss von VEGF in Endothelzellen nachweisen (Spyridopoulos *et al.*, 1997; Watanabe & Dvorak, 1997; Nor *et al.*, 1999). Darüber hinaus scheint VEGF auch in nicht-Endothelzellen einen Schutz vor dem programmierten Zelltod zu bieten (Katoh *et al.*, 1998). Die Umgehung der Apoptose durch VEGF wird zum einen auf eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 durch VEGF zurückgeführt (Nor *et al.*, 1999; Pidgeon *et al.*, 2001). Zum anderen wird die Aktivierung des MAPK/ERK Signalwegs zusammen mit einer Inhibierung der SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-jun NH2-kinase*) Aktivität durch VEGF diskutiert (Gupta *et al.*, 1999). In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 hat VEGF dagegen weder einen Einfluss auf die Apoptose noch auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen. VEGF hat in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa eine geringe Wirkung sowohl auf die Apoptose als auch auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Dieses Ergebnis unterstreicht ebenfalls die Abhängigkeit der Apoptose vom zellulären Kontext.

Die Transfektion von  $\beta$ -Catenin siRNA zeigte, soweit untersucht, keine Wirkung auf die Lebensfähigkeit von Tumorzellen.

In Abbildung 5.4 ist ein Modell der Rolle des Wnt Signalwegs in der Apoptose zu sehen.



**Abb. 5.4: Zusammenhänge zwischen dem Wnt Signalweg und der Apoptose in Tumorzellen.** Der Wnt Signalweg hat die Fähigkeit die Apoptose in Tumorzellen mit Hilfe verschiedener Zielgene gegensätzlich zu beeinflussen. So wirken Cyclin D1 und c-Myc proapoptotisch, während VEGF zellkontextabhängig an der Inhibierung der Apoptose und somit an dem Erhalt der Lebensfähigkeit beteiligt ist.

## 5.5 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Stoffwechsellätigkeit und Mitochondrienaktivität in Tumorzellen

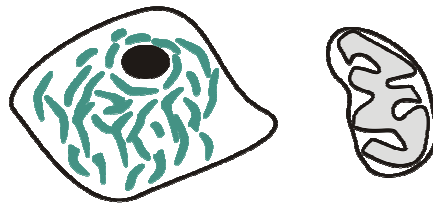
Mitochondrien spielen in verschiedenen zellulären Prozessen wie Wachstum, Teilung, Energiemetabolismus und Apoptose eine Schlüsselrolle (Alirol & Martinou, 2006; Desagher & Martinou, 2000). In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass es sich bei Mitochondrien um dynamische Strukturen handelt. Im Laufe des Lebens einer Zelle verschmelzen und teilen sich Mitochondrien kontinuierlich, so dass das mitochondriale Netzwerk einer stetigen Umgestaltung unterliegt (Okamoto & Shaw, 2005). Diese morphologischen Veränderungen tragen zur Rolle der Zellorganellen in der Zellphysiologie bei (Alirol & Martinou, 2006). Störungen der mitochondrialen Funktionen werden mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter altersbedingte Erkrankungen und Krebs (Wallace, 2005). Dabei ist die Beteiligung der Mitochondrien an der Tumorgenese nicht auf die Anreicherung von schädlichen Molekülen wie reaktive Sauerstoffmoleküle (*reactive oxygen species*, ROS) oder apoptotische Proteine beschränkt. Die mitochondriale Energieproduktion beeinflusst vielmehr sowohl die Zellproliferation als auch die Tumorprogression.

Ein veränderter Energiemetabolismus ist eine weitere charakteristische Eigenschaft von Tumorzellen (Alirol & Martinou, 2006). Normale Säugerzellen erlangen ihre Energie hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, wohingegen Tumorzellen eine gesteigerte Glykolyserate und Laktatproduktion aufweisen. Da dies ebenfalls in Gegenwart von Sauerstoff der Fall ist, wird dieses Phänomen auch aerobe Glykolyse genannt und wurde erstmals 1956 beschrieben (Warburg, 1956a). Die aerobe Glykolyse, bei der insgesamt weniger ATP gewonnen wird als im Verlauf des Zitronensäurezyklus in Mitochondrien, bedeutet dennoch einen Wachstumsvorteil für Tumorzellen (Gatenby & Gillies, 2004). Zum einen können sich Tumorzellen so an

hypoxische Bedingungen adaptieren, zum anderen führt es zur Ansäuerung der direkten Tumorumgebung (Abbildung 5.5 B). Dies wiederum erleichtert die Invasion des Tumors (Gatenby & Gawlinski, 1996; Schornack & Gillies, 2003). Eine solche Veränderung des Metabolismus kann ebenfalls in humanen Tumorzelllinien beobachtet werden. Ein Beispiel hierfür sind HeLa Zellen, in denen nur ein geringer Teil der verfügbaren Glukose im Zitronensäurezyklus metabolisiert wird, während der Hauptteil in Laktat umgewandelt wird (Reitzer *et al.*, 1979). Neuere Studien zeigen, dass die Verteilung der Mitochondrien eng mit dem Energiemetabolismus einer Zelle verbunden ist (Alirol & Martinou, 2006) (Abbildung 5.x). Eine gesteigerte Zellatmung korreliert mit einem zusammenhängenden, weit verzweigten Mitochondriennetzwerk (respirativer Phänotyp, Abbildung 5.5 A). Vorwiegend kleine Mitochondrien hingegen kennzeichnen eine verringerte oxidative Phosphorylierung und eine erhöhte Glykolyserate (glykolytischer Phänotyp, Abbildung 5.5 B). Darüber hinaus geht die Mitochondrienverteilung ebenfalls mit dem Übergang der G<sub>1</sub> in die S-Phase im Zellzyklus einher. So konnte gezeigt werden, dass das Mitochondriennetzwerk in Fibroblasten und Osteosarkomzellen während der G<sub>1</sub>-Phase weit verzweigt ist, während es in der S-Phase fragmentiert vorliegt (Barni *et al.*, 1996; Margineantu *et al.*, 2002). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen während der G<sub>1</sub>-Phase eine hohe Zellatmung aufweisen und so große Mengen ATP synthetisieren, die dann die notwendige Energie für eine spätere S-Phase bereitstellen. Eine erhöhte oxidative Phosphorylierung in der S-Phase könnte aufgrund der hohen ROS Produktion einen verheerenden Schaden verursachen, so dass die Aktivität der Zellatmung in dieser Phase des Zellzyklus gesenkt wird. Somit ist die Beteiligung der Mitochondrien in der Tumorentstehung nicht nur auf die Apoptose beschränkt, sondern beeinflusst auch Zellproliferation und Tumorprogression (Alirol & Martinou, 2006).

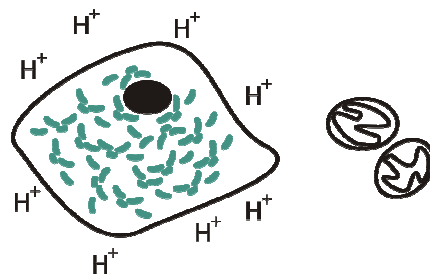
### A respirativer Phänotyp

Glykolyse → Pyruvat → Zitronensäurezyklus



### B glykolytischer Phänotyp

Glykolyse → Pyruvat → Laktat



**Abb. 5.5: Die Form der Mitochondrien verändert sich mit dem Energiestatus** (modifiziert nach Alirol & Martinou, 2006). (A) Schematische Darstellung des respiratorischen Phänotyps. In normalen Säugerzellen wird die Energie vorwiegend durch Zellatmung gewonnen. Dabei wird Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, im Zitronensäurezyklus verstoffwechselt. Das mitochondriale Netzwerk erscheint weit verzweigt und die Cristae sind vergrößert. (B) Schematische Darstellung des glykolytischen Phänotyps. Tumorzellen weisen häufig eine erhöhte Glykolyserate auf. Die Energiegewinnung erfolgt hierbei durch Fermentierung von Pyruvat zu Laktat, was zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raumes führt. Die Mitochondrien sind fragmentiert und die Matrix vergrößert.

Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit neben der aeroben Glykolyse sowohl die Mitochondrienmasse und die Verteilung der Zellorganellen, als auch die Aktivität derselben bestimmt. Als Indikator für die Glykolyse diente hierbei die mRNA Menge von Hexokinase-2, eines bekannten c-Myc Zielgens (Kim *et al.*, 2004a). Zur Bestimmung der Mitochondrienmasse wurde der Farbstoff MitoTracker® Green FM verwendet, der spezifisch mit Lipiden der Mitochondrienmembran interagiert (Pendergrass *et al.*, 2004). Der Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Mitochondrienmasse wurde dabei mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Verwendung des Farbstoffs in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gab Aufschluss über die Verteilung der Zellorganellen. Als Indikator für die Mitochondrienaktivität wurde zum einen die Transkription von *PDHB*

bestimmt. Zum anderen wurde das Gen *NDUFVI* untersucht, das einen Teil des NADH Dehydrogenase Multienzymkomplexes kodiert. Sowohl *NDUFVI* als auch *PDHB* wurden kürzlich als durch Cyclin D1 inhibierte Gene beschrieben (Sakamaki *et al.*, 2006). Eine Zusammenfassung der Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf den Energiemetabolismus in Tumorzellen ist in Tabelle 5.4 dargestellt (vergleiche Tabelle 4.17).

**Tab. 5.4: Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Mitochondrienfunktion und den Stoffwechsel von Tumorzellen.** Zu sehen ist die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die untersuchten Parameter in den verschiedenen Zelllinien. – bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung.

		<b>Aerobe Glykolyse</b>	<b>Mitochondrien- masse</b>	<b>Mitochondrien- aktivität</b>
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	○	–	–
	SW480 Zellen	○	–	–
	HeLa Zellen	○	–	–
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	+	+	○
	SW480 Zellen	+	○	○
	HeLa Zellen	+	○	○
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	–	+	–
	SW480 Zellen	○	+	+
	HeLa Zellen	○	+	+
<b>β-Catenin</b>	HCT116 Zellen	+	–	+
	SW480 Zellen	+	○	○
	HeLa Zellen	+	–	+

Die Untersuchung der Hexokinase-2 mRNA Menge nach Cyclin D1 siRNA Behandlung ergab in keiner der untersuchten Zelllinien eine Änderung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Analysen mittels Durchflusszytometrie ergaben, dass die Behandlung der verschiedenen Tumorzelllinien mit Cyclin D1 siRNA dagegen zu einer Erhöhung der MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität führte. Darüber hinaus wurde die Transkription sowohl von *PDHB* als auch von *NDUFVI* in HCT116 Zellen beziehungsweise die Transkription von *PDHB* in SW480 Zellen und *NDUFVI* in HeLa Zellen aktiviert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Cyclin D1 in allen untersuchten Tumorzelllinien sowohl die Masse als auch die Aktivität der Mitochondrien inhibiert. Dies ist in Übereinstimmung mit Sakamaki *et al.* (2006), die ebenfalls zeigen konnten, dass Cyclin D1 den glykolytischen Phänotyp der Mitochondrien fördert. Jedoch hat Cyclin D1 im

Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Gruppe keinen Einfluss auf die Glykolyse. Daraus ergibt sich, dass Cyclin D1 nicht nur für den Übergang der Zellen von der G<sub>1</sub> in die S-Phase entscheidend ist, sondern auch die Ausdehnung und die Aktivität der Mitochondrien inhibiert und folglich die Bildung von ROS vermindert. ROS können in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus schwere Schäden anrichten, die jedoch in der S-Phase nicht mehr repariert werden (Barni *et al.*, 1996; Margineantu *et al.*, 2002). Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass es nicht nur in Fibroblasten und Osteosarkomzellen einen Zusammenhang zwischen der Zellzyklusprogression und der Ausdehnung des Mitochondriennetzwerkes gibt, sondern auch in Kolonkarzinom- beziehungsweise Zervixkarzinomzellen. Außerdem konnte in dieser Arbeit das Wnt Zielgen Cyclin D1 als ein Vermittler dieser Prozesse identifiziert werden. Die Untersuchung mittels RNA Interferenz zeigte damit eine Normalisierung der Tumorzellen nach Inaktivierung von Cyclin D1.

Die Behandlung mit c-Myc siRNA führte in allen Tumorzelllinien zu einer Senkung der Hexokinase-2 mRNA Menge. Außerdem zeigte sich in HCT116 Zellen in der Durchflusszytometrie ein Rückgang der MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität, während in den anderen Zelllinien kein Effekt zu beobachten war. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennen. Die Analyse mittels quantitativer *real-time* RT PCR ergab keine Änderungen des Pyruvat Dehydrogenase- beziehungsweise NADH Dehydrogenase mRNA Gehalts in den untersuchten Zelllinien.

Der Einfluss von c-Myc auf die Mitochondrien ist zellkontextabhängig. So hat c-Myc lediglich in HCT116 Zellen einen positiven Einfluss auf die Mitochondrienmasse. Dagegen war keine Wirkung auf die Mitochondrienaktivität feststellbar. Allerdings wird in allen untersuchten Zelllinien die Transkription von *HK2* durch c-Myc aktiviert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Förderung der aeroben Glykolyse durch c-Myc in Tumorzellen hin und sind in Übereinstimmung mit Kim *et al.* (2004a), die *HK2* als c-Myc Zielgen beschrieben. Außerdem konnten weitere Studien zeigen, dass c-Myc in vielen humanen Tumoren die Glykolyse unabhängig vom Sauerstoffgehalt aktiviert, in der so genannten aeroben Glykolyse (Kim & Dang, 2006; Gatenby & Gillies, 2004; Warburg, 1956a; Warburg, 1956b). Eine Vielzahl glykolytischer Enzyme und Glukosetransporter werden direkt oder indirekt durch c-Myc aktiviert (Shim *et al.*, 1997; Osthus *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004a).

In HCT116 Zellen zeigte sich nach VEGF siRNA Behandlung eine Erhöhung der Hexokinase-2 mRNA Menge, wohingegen in den anderen untersuchten Zelllinien kein Einfluss zu verzeichnen war. Darüber hinaus zeigten mit VEGF siRNA behandelte Zellen

einen Rückgang der MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität sowohl in den Analysen mittels Durchflusszytometrie als auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. In HCT116 Zellen führte die Transfektion der VEGF siRNA zu einer Erhöhung des Pyruvat Dehydrogenase- und NADH Dehydrogenase mRNA Gehaltes. Darüber hinaus war ein Rückgang des NADH Dehydrogenase mRNA Gehaltes in SW480 Zellen beziehungsweise der Pyruvat Dehydrogenase mRNA Menge in HeLa Zellen zu beobachten.

Die Wirkung von VEGF auf die Mitochondrienfunktion und den Metabolismus ist ebenfalls zellkontextabhängig. Während es in allen untersuchten Tumorzelllinien zu einer Erhöhung der Mitochondrienmasse beiträgt, wird die Mitochondrienaktivität in HCT116 Zellen gehemmt, in SW480 und HeLa Zellen dagegen positiv beeinflusst. Eine Wirkung auf die Glykolyserate ist nur in HCT116 Zellen zu beobachten, wo es die aerobe Glykolyse durch Reprimierung von *HK2* inhibiert. *VEGF* ist nicht nur ein Zielgen des Wnt Signalwegs, sondern wird unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) aktiviert (Forsythe *et al.*, 1996). Weiterhin induziert HIF-1 viele Gene, deren Produkte in die Glykolyse involviert sind, und erlaubt Tumorzellen so unter hypoxischen Bedingungen effizienter Glukose aufzunehmen und Pyruvat zu Laktat zu metabolisieren (Semenza *et al.*, 1994; Wang & Semenza, 1993; Gordan & Simon, 2007; Semenza *et al.*, 2006). Allerdings unterstützt HIF-1 auf diese Weise nicht nur die aerobe Glykolyse, sondern unterdrückt beziehungsweise optimiert darüber hinaus die Mitochondrienfunktion (Kim *et al.*, 2007), indem es die Transkription von *PDK1* (kodiert Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1) aktiviert, dessen Produkt wiederum Pyruvat Dehydrogenase inhibiert (Holness & Sudgeon, 2003; Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006). Die Pyruvat Dehydrogenase ist, wie bereits erwähnt, der zentrale Vermittler des Zitronensäurezyklus und der Glykolyse, da es in die Umbildung von Pyruvat in Acetyl-Coenzym A in den Mitochondrien involviert ist. Die im Gegensatz dazu stehende beobachtete Förderung der Mitochondrienausdehnung durch VEGF könnte eine weitere Möglichkeit für eine HIF-1 vermittelte Feinabstimmung des veränderten Energiemetabolismus der Krebszellen sein.

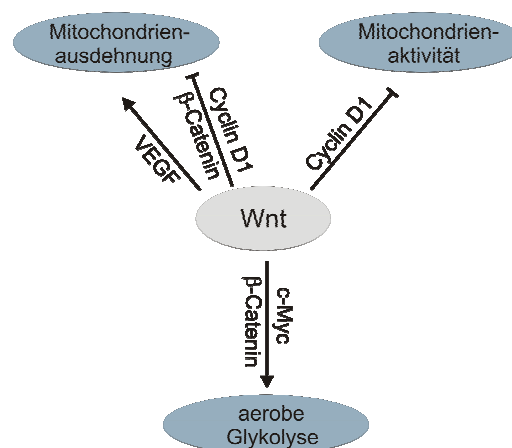
Die Untersuchung der Hexokinase-2 mRNA Menge zeigte nach  $\beta$ -Catenin siRNA Behandlung in den Tumorzelllinien SW480 und HeLa einen Rückgang. Darüber hinaus führte die Transfektion in HCT116 und HeLa Zellen zu einer Erhöhung der MitoTracker<sup>®</sup> Green FM Fluoreszenzintensität, die sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden konnte. Außerdem führte die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA zu einer Senkung des Pyruvat Dehydrogenase mRNA



Gehalts in den untersuchten Zelllinien und der NADH Dehydrogenase mRNA Menge in HCT116 und HeLa Zellen.

Somit beeinflusst  $\beta$ -Catenin zumindest teilweise die Mitochondrienmasse negativ, während es die -aktivität erhöht. Darüber hinaus fördert es die aerobe Glykolyse durch Aktivierung der Transkription von *HK2*. Die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA ergab, dass der Wnt Signalweg seinen Einfluss auf den Energiemetabolismus der Tumorzellen durch unterschiedliche Zielgene ausübt. Der glykolytische Phänotyp wird durch das Zielgen Cyclin D1 erreicht, während die Energieversorgung durch c-Myc vermittelte Glykolyse erfolgt.

Die ausgewählten Wnt Zielgene haben damit teils gegensätzliche Wirkung auf die Ausdehnung und Aktivität von Mitochondrien sowie auf die Glykolyserate von Tumorzellen. Ein allgemeines Modell des Einflusses des Wnt Signalwegs auf den Energiemetabolismus der Tumorzellen ist in Abbildung 5.6 zu sehen.



**Abb. 5.6: Regulation des Energiemetabolismus von Tumorzellen durch den Wnt Signalweg.** Dieses Modell zeigt die Inhibierung des Mitochondriennetzwerkes sowie der Mitochondrienaktivität durch Cyclin D1. Die Förderung der aeroben Glykolyse in Krebszellen erreicht der Wnt Signalweg unter anderem durch c-Myc. Interessanterweise wird die Mitochondrienausdehnung durch den Wnt Signalweg nicht nur inhibiert, sondern durch andere Zielgene wie VEGF gefördert.

## 5.6 Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration und zelluläre Adhäsion von Tumorzellen

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Karzinogenese ist die gesteigerte Migration und geringe Adhäsion von Tumorzellen. An der Regulation der Bewegung von Zellen ist das Aktinzytoskelett beteiligt. Es befindet sich unterhalb der Zellmembran und vermittelt eine Vielzahl an wichtigen biologischen Funktionen von eukaryotischen Zellen. So bestimmt es

darüber hinaus die Zellform und Polarität und reguliert die Teilung von Zellen (Hall, 1998). Die Bewegung von Zellen ist ein komplexes Phänomen und kann in drei Phasen unterteilt werden: Vorstülpen des vorderen Teils der Zelle, Anheftung an das Substrat und Ablösung des Zellkörpers sowie des hinteren Teils und schließlich die Kontraktion des Zytoskeletts, welche die Zelle vorwärts zieht (Ananthakrishnan & Ehrlicher, 2007). Das Aktinzytoskelett wird durch Mitglieder der Familie der Rho GTPasen reguliert. Am besten untersucht sind hierbei RhoA, Rac1 und Cdc42. RhoA induziert einerseits die Ausbildung von Aktinomyosinfasern (Stressfasern), die eine wichtige Rolle bei der Zellkontraktion spielen, und andererseits die Entstehung von Adhäsionsplaques, die für die Ausbildung von Zell-Substrat Kontakten essentiell sind. Rac1 ist in die Ausbildung netzartiger Membranfortsätze (Lamellipodien) involviert, während die Cdc42-vermittelte Polymerisation von Aktin zu langen, fingerähnlichen Ausstülpungen der Zellmembran (Filopodien) führt (Hall, 1998).

An der zellulären Adhäsion und damit an der Bildung von Zell-Zellkontakten ist vorwiegend E-Cadherin beteiligt, welches Proteine der Adhärenzverbindungen mit dem Aktinzytoskelett verknüpft (Brembeck *et al.*, 2006). Zur Charakterisierung der Rolle des Wnt Signalwegs und der Zielgene bei der Migration und Ausbildung von Zell-Zellkontakten, wurden zunächst Migrationsassays durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Aktinzytoskelett mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Des Weiteren diente die E-Cadherin-Markierung siRNA behandelte Tumorzellen der näheren Bestimmung von Zell-Zellkontakten. Zusätzlich wurden Zell-Substrat-Kontakte mittels Vinculin/Phalloidin Komarkierung untersucht. Da diese jedoch in keiner der Untersuchungen einen signifikanten Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Ausbildung der Zell-Substrat Verbindungen erbrachte, wird im Folgenden nicht weiter darauf eingegangen. Außerdem erfolgten zur Bestimmung morphologischer Änderungen sowohl lichtmikroskopische Aufnahmen als auch Tubulin-Markierungen siRNA behandelte Zellen. Die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Migration und Adhäsion von Tumorzellen ist in Tabelle 5.5 zusammengefasst (vergleiche Tabelle 4.22).

**Tab. 5.5.: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf Migration und Adhäsion von Tumorzellen.** Zu sehen ist die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die untersuchten Parameter in den verschiedenen Zelllinien. – bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Im Fall der Zellmorphologie bedeutet + eine Veränderung Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung. n.a.: nicht analysiert.

		<b>Migration</b>	<b>Aktin- zytoskelett</b>	<b>Zell-Zell- Kontakte</b>	<b>Zell- morphologie</b>
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	+	–	–	+
	SW480 Zellen	+	–	–	+
	HeLa Zellen	+	n.a.	○	○
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	–	–	○	○
	SW480 Zellen	○	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	○	–	○	+
	SW480 Zellen	–	○	○	○
	HeLa Zellen	○	n.a.	○	○
<b>β-Catenin</b>	HCT116 Zellen	+	–	–	○
	SW480 Zellen	○	○	–	○
	HeLa Zellen	+	n.a.	○	○

Zur weiteren Analyse der Migration wurde der mRNA Gehalt von Thrombospondin-1 und ROCK2 untersucht. Bei diesen handelt es sich um bekannte Inhibitoren der Zellmigration. Zu den Substraten von ROCK zählen unter anderem die Kinasen MLC (*myosin light chain*) und LIM, deren Aktivierung zu der Ausbildung von Stressfasern und somit einer geringeren Migrationsrate führt (Li *et al.*, 2006a). Die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription von *TSP1* und *ROCK2* ist in Tabelle 5.6 zusammengefasst (vergleiche Tabelle 4.23).

**Tab. 5.6.: Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription ausgewählter Migrationsinhibitoren in Tumorzellen.** Zu sehen ist die Regulation der Gene durch den Wnt Signalweg. – bezeichnet einen negativen Einfluss, während + einen positiven Effekt anzeigt. Das Zeichen ○ bedeutet keine Änderung.

		<i>TSP1</i>	<i>ROCK2</i>
<b>Cyclin D1</b>	HCT116 Zellen	+	+
	SW480 Zellen	○	+
	HeLa Zellen	○	○
<b>c-Myc</b>	HCT116 Zellen	○	○
	SW480 Zellen	○	+
	HeLa Zellen	–	○
<b>VEGF</b>	HCT116 Zellen	–	–
	SW480 Zellen	+	+
	HeLa Zellen	○	○
<b>β-Catenin</b>	HCT116 Zellen	○	+
	SW480 Zellen	○	○
	HeLa Zellen	+	+

Die Behandlung der Zellen mit Cyclin D1 siRNA führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer verlangsamten Migration. In HeLa Zellen ließ sich dieses Ergebnis im Wundheilungsassay bestätigen. Das Aktinzytoskelett erschien vor allem in HCT116 und SW480 Zellen in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ungeordnet und die Durchflusszytometrie zeigte einen höheren Gehalt an polymerisiertem Aktin. Darüber hinaus war in der E-Cadherin-Markierung in Cyclin D1 siRNA behandelten HCT116 und SW480 Zellen im Vergleich zu *non-targeting* siRNA transfizierten Kontrollzellen eine deutliche Ausbildung von Zell-Zell Adhärenzverbindungen zu beobachten. Die Betrachtung der Zellmorphologie zeigte ebenfalls eine größere Ausdehnung Cyclin D1 siRNA behandelter HCT116 und SW480 Zellen. Die Wirkung des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene auf die Transkription von *TSP1* und *ROCK2* ist deutlich vom zellulären Kontext geprägt. So führte die Behandlung mit Cyclin D1 siRNA in HCT116 Zellen zu einer Senkung des *TSP1* und *ROCK2* mRNA Gehaltes, während es in SW480 Zellen lediglich auf die Transkription von *ROCK2* einen Einfluss hatte, wo ebenfalls eine Senkung zu beobachten war. In HeLa Zellen war keine Wirkung zu verzeichnen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cyclin D1 die Migration von Tumorzellen fördert. Dabei hat es nicht nur auf die Aktinpolymerisation dieser Zellen einen Einfluss, sondern destabilisiert außerdem E-Cadherin vermittelte Adhäsionsverbindungen, was ebenfalls zur Förderung der Migration beiträgt. Auch die Untersuchungen der Zellmorphologie, die einen

Einfluss auf die Ausbreitung der Zellen zeigten, unterstützen diese Aussage. Die Ergebnisse bestätigen neuere Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Makrophagen und MEFs (*mouse embryo fibroblasts*) aus Cyclin D1 defizienten Mäusen eine erhöhte zelluläre Adhäsion und Beeinträchtigungen in der zellulären Migration aufweisen als solche aus Wildtyp Mäusen (Neumeister *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde ebenfalls eine großflächige Ausbreitung der Zellen beobachtet. Li *et al.* (2006a) führten diesen Einfluss auf die Inhibierung der Transkription von *TSP1* und *ROCK2* durch Cyclin D1 zurück. Weitere Studien an MEFs zeigten eine Beteiligung von p27<sup>Kip1</sup> an der Förderung der Migration durch Cyclin D1 (Li *et al.*, 2006b). Bei p27<sup>Kip1</sup> handelt es sich um ein Mitglied der Cip/Kip Familie von CDK Inhibitoren. Wenn sich p27<sup>Kip1</sup> im Zellkern befindet, ist es an der Hemmung der Zellproliferation beteiligt. Allerdings ist es ein ungewöhnliches Tumorsuppressorprotein, da es in Krebszellen häufig aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert wird und im Gegensatz zu anderen CDK-Inhibitoren nicht vollständig abgebaut wird (Bloom & Pagano, 2003; Slingerland & Pagano, 2000; Philipp-Staheli *et al.*, 2001). Das Protein p27<sup>Kip1</sup> wirkt im Zytoplasma als Regulator des Zytoskeletts und der Zellmigration (McAllister *et al.*, 2003), indem es an RhoA bindet und so die Interaktion mit dem aktivierenden GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) inhibiert (Besson *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p21 im Zytoplasma an die RhoA Effektoren ROCK1 und -2 binden und diese inhibieren kann (Tanaka *et al.*, 2002; Lee & Helfman, 2003). Schließlich bindet ein weiterer CDK Inhibitor, p57<sup>KIP2</sup>, an die Kinase LIMK1, ohne dessen Aktivität direkt zu inhibieren. Allerdings führt diese Interaktion zu einer nukleären Lokalisation der Kinase und so zu dessen Hemmung (Yokoo *et al.*, 2003). Daraus lässt sich schließen, dass Proteine der Cip/Kip Familie den Rho Signalweg an verschiedenen Punkten hemmen. Dies führt insgesamt zu einem Rückgang der Rho-induzierten Bildung von Stressfasern und Fokaladhäsionen. In diesem Modell fördert Cyclin D1 die Migration von Zellen, indem es p27<sup>Kip1</sup> vor der Degradation schützt und so den Proteingehalt erhöht (Li *et al.*, 2006b). In dieser Arbeit konnte die Inhibition von *TSP1* und *ROCK2* durch Cyclin D1 nicht bestätigt werden (Li *et al.*, 2006a). Dies bedeutet, dass die beobachtete Förderung der Migration durch Cyclin D1 nicht auf einen direkten Einfluss auf die Transkription dieser Gene zurückzuführen ist. Zur Aufklärung des Mechanismus sollte in Zukunft die Aktivität der Aktinzytoskelett regulierenden Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 bestimmt werden.

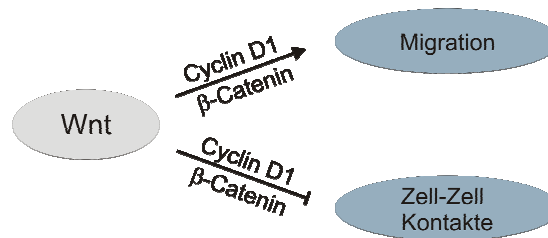
Die Behandlung der Tumorzellen mit c-Myc siRNA führte zellkontextspezifisch zu einer gesteigerten Migrationsrate und einem geringeren Gehalt an polymerisiertem Aktin. Außerdem hatte die Verwendung der c-Myc siRNA in SW480 Zellen einen Rückgang der

ROCK2 mRNA Menge zur Folge, während es in HeLa Zellen zu einer erhöhten Transkription von *TSP1* führte. VEGF siRNA behandelte Zellen zeigten ebenfalls zellkontextspezifisch eine gesteigerte Migrationsrate und einen geringeren F-Aktin Gehalt. Außerdem erschien in VEGF siRNA behandelten HCT116 Zellen die Zellmorphologie schmal und lang gestreckt. Lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Zellen zeigten darüber hinaus viele tote Zellen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen der Lebensfähigkeit. Dort zeigte sich in VEGF siRNA behandelten HCT116 Zellen ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate. Weiterhin kam es dort zu einer Erhöhung des TSP1 und ROCK2 mRNA Gehaltes. Im Gegensatz dazu war in SW480 Zellen jeweils eine Senkung zu beobachten.

Die teilweise gesteigerte Migrationsrate in c-Myc siRNA- und VEGF siRNA behandelten Zellen deutet darauf hin, dass die Inhibition der Migration und der Einfluss auf die Aktinpolymerisation durch diese Wnt Zielgene vom zellulären Kontext abhängen. Dabei konnte die Inhibierung von Thrombospondin-1 durch c-Myc nicht bestätigt werden (Volpert *et al.*, 2002; Watnick *et al.*, 2003).

Die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA hatte in HCT116 und HeLa Zellen, nicht jedoch in SW480 Zellen eine verlangsamte Migration zur Folge. Außerdem wurde in HCT116 Zellen im Gegensatz zu SW480 Zellen ein erhöhter Anteil an polymerisiertem Aktin festgestellt, das in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ungeordnet erschien. Die Untersuchung der E-Cadherin-Markierung  $\beta$ -Catenin siRNA behandelter Kolonkarzinomzellen zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutliche Ausprägung von Zell-Zellkontakten, wohingegen dieser Effekt in HeLa Zellen nicht beobachtet werden konnte. Ein Einfluss auf die Zellmorphologie wurde dagegen nicht festgestellt. In HCT116 Zellen führte die Verwendung der  $\beta$ -Catenin siRNA zu einem Rückgang des ROCK2 mRNA Gehaltes, während in HeLa Zellen ebenfalls eine Senkung der *TSP1* Transkription zu beobachten war. Somit ist der Einfluss der  $\beta$ -Catenin siRNA auf die Migration und Adhäsion von Tumorzellen ähnlich zur Wirkung der Cyclin D1 siRNA, was darauf schließen lässt, dass die Förderung der Migration ein wichtiger Aspekt des Wnt Signalwegs ist. Dies kann entweder durch Cyclin D1 oder andere Zielgene vermittelt werden.

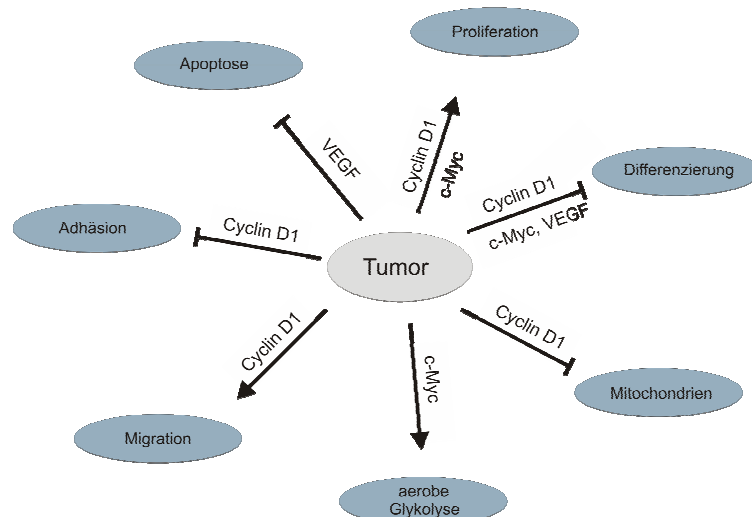
Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse lässt sich der Einfluss des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene in folgendem Modell in Abbildung 5.7 zusammenfassen.



**Abb. 5.7: Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Migration von Tumorzellen.** Das Modell beschreibt die migrationsfördernde Wirkung des Wnt Signalwegs durch Cyclin D1. Dieses Zielgen hat darüber hinaus die Fähigkeit Adhäsionsverbindungen zwischen benachbarten Zellen zu destabilisieren und so ebenfalls die Zellbewegung zu fördern.

## 5.7 Der Wnt Signalweg, seine Zielgene und die Tumorgenesse

Basierend auf dem Modell von Hanahan und Weinberg (2000) wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte der Karzinogenese untersucht (vergleiche Abbildung 5.1). Aufgrund der Inaktivierung einzelner Wnt Zielgene mittels siRNA konnte die Rolle des Wnt Signalwegs in diesem Prozess charakterisiert und folgendes Modell erstellt werden (Abbildung 5.8).



**Abb. 5.8: Die Rolle des Wnt Signalwegs in der Karzinogenese.** Das Modell zeigt den Einfluss verschiedener Wnt Zielgene auf charakteristische Änderungen im Verlauf der Tumorentwicklung.

Die Ergebnisse zeigen, dass Cyclin D1 und c-Myc notwendig sind für die Proliferation der Tumorzellen. Die Untersuchung von p21 deutet auf eine Beteiligung der überprüften Wnt Zielgene an der Inhibition der Differenzierung hin. Der veränderte Energiemetabolismus wird wiederum unter anderem durch die primären Zielgene Cyclin D1 und c-Myc erreicht,

indem Cyclin D1 sowohl die Ausdehnung als auch die Aktivität von Mitochondrien hemmt und c-Myc die aerobe Glykolyse zur Bereitstellung von ATP fördert. Somit konnte erstmals eine Beteiligung des Wnt Signalswegs an der Mitochondrienverteilung gezeigt werden. Darüber hinaus weist die durch Cyclin D1 vermittelte Kopplung der Proliferation und der Energiegewinnung von Tumorzellen auf einen wichtigen Aspekt in der Karzinogenese hin. Die Untersuchung mittels RNA Interferenz zeigte nach Cyclin D1 Inaktivierung eine Normalisierung sowohl der Zellproliferation als auch der Ausdehnung des Mitochondriennetzwerks in Tumorzellen.

Auch die Migration wird maßgeblich durch Cyclin D1 gefördert, da es einerseits die Migrationsrate durch seinen Einfluss auf die Aktinpolymerisation steigert und andererseits die Ausbildung von Adhärenzverbindungen inhibiert. Die Hemmung der Apoptose kann durch VEGF erreicht werden.



## 6. Zusammenfassung

Die Krebsentstehung ist ein mehrstufiger Prozess, in dessen Verlauf die Zellen unterschiedliche biochemische und zellbiologische Veränderungen durchlaufen. Neben anderen charakteristischen Kennzeichen zählen hierzu die Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen und der Verlust der Fähigkeit, als Reaktion auf interne oder externe Signale, die Apoptose einzuleiten. Hierdurch wird das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod innerhalb des Gewebes zugunsten der Zellteilung verschoben. Darüber hinaus sind Eigenschaften wie eine erhöhte Migration und eine verringerte Adhäsion Voraussetzungen für das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. Außerdem weisen Tumorzellen einen veränderten Energiemetabolismus auf, der den gesteigerten Energiebedarf der Zellen deckt. Der kanonische Wnt Signalweg, der durch eine Vielzahl von Zielgenen in unterschiedliche Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose involviert ist, führt bei Fehlregulation zur Tumorentstehung. Allerdings ist die exakte Rolle des Wnt Signalwegs und seiner Zielgene in der karzinogenen Kaskade bislang noch nicht genau bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Beteiligung der Wnt Zielgene Cyclin D1, c-Myc und VEGF an der Karzinogenese untersucht werden. Hierzu wurden einige charakteristische Kennzeichen der Tumorentwicklung wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Energiemetabolismus sowie Migration und Adhäsion in Kolonkarzinom- und Zervixkarzinomzellen mittels RNA Interferenz analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cyclin D1 und c-Myc im Rahmen der Zellzyklusprogression für den G<sub>1</sub>/S Übergang der Zellen notwendig sind. Neben VEGF nehmen sie außerdem Einfluss auf die Differenzierung. Darüber hinaus ist Cyclin D1 an der Verringerung der Mitochondrienmasse beteiligt und hemmt die Aktivität dieser Zellorganellen in der Zellatmung. Die Untersuchung mittels RNA Interferenz zeigte dabei eine Normalisierung der Tumorzellen nach Inaktivierung von Cyclin D1. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals ein Zusammenhang zwischen Proliferation und Mitochondrienbildung in Kolonkarzinom- und Zervixkarzinomzellen gezeigt und Cyclin D1 als ein Vermittler dieser Prozesse identifiziert werden. Eine Kopplung der Zellzyklusprogression und der Energiegewinnung könnte hinsichtlich einer verringerten Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS, *reactive oxygen species*) von Bedeutung sein. ROS können während der Zellzyklusprogression schwere Schäden anrichten, die in der S-Phase nicht mehr repariert werden. Die Energiegewinnung der Tumorzellen ist hierbei unter anderem durch die c-Myc vermittelte aerobe Glykolyse gewährleistet. Der Einfluss des Wnt

Signalwegs auf die Apoptose von Tumorzellen ist dagegen abhängig vom untersuchten Zielgen. Während Cyclin D1 und c-Myc vermutlich durch ihre proliferationsfördernden Eigenschaften proapoptotisch wirken, wird die Umgehung der Apoptose zellkontextabhängig durch VEGF erreicht. An der erhöhten Migration von Tumorzellen ist maßgeblich Cyclin D1 beteiligt, da es einerseits die Migrationsrate durch seinen Einfluss auf die Aktinpolymerisation steigert und andererseits die Ausbildung von Adhärenzverbindungen inhibiert.

Abschließend lässt sich sagen, dass die untersuchten Wnt Zielgene in einigen Prozessen eine ähnliche Funktion haben, wie zum Beispiel Cyclin D1 und c-Myc in der Progression des Zellzyklus, während sie in anderen eine gegensätzliche Wirkung aufweisen, wie etwa in der Mitochondrienbildung. Deshalb ist der Einfluss des Wnt Signalwegs durch die untersuchten Zielgene maßgeblich vom zellulären Kontext bestimmt, was vor allem in der Wirkung von VEGF auf die Apoptose zu beobachten ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit helfen, den komplexen Prozess der Tumorentwicklung und die Rolle, die der Wnt Signalweg und seine einzelnen Zielgene dabei spielen, besser zu verstehen.

## Literaturverzeichnis

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

**Adams, C. L. & Nelson, W. J.** (1998): Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 572-577.

**Adhikary, S. & Eilers, M.** (2005): Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635-645.

**Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. & Pestell, R. G.** (1995): Transforming p21Ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* 270, 23589-23597.

**Alirol, E. & Martinou, J. C.** (2006): Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene* 25, 4706-4716.

**Amati, B.** (2001): Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat. Cell Biol.* 3, E112-113.

**Amerongen, R. & Berns, A.** (2006): Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 22, 678-689.

**Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. s., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y. & Alkalay, I.** (2002): Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066-1076.

**Ananthkrishnan, R. & Ehrlicher, A.** (2007): The forces behind cell movement. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 303-317.

**Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C. & Romagnolo, B. (2005):** Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132, 1443-1451.

**Arce, L., Yokoyama, N. N., & Waterman, M. L. (2006):** Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492-7504.

**Arnold, I. & Watt, F. M. (2001):** c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr. Biol.* 11, 558-568.

**Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. & Cleveland, J. L. (1991):** Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922.

**Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. & Yaniv, M. (2000):** Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* 19, 2056-2068.

**Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. & Clevers, H. (2007):** Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-1008.

**Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. & Clevers, H. (2001):** The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 20, 4935-4943.

**Barni, S., Sciola, L., Spano, A. & Pippia, P. (1996):** Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech. Histochem.* 71, 66-70.

**Barr, L. F., Campbell, S. E., Diette, G. B., Gabrielson, E. W., Kim, S., Shim, H. & Dang, C. V. (2000):** c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 60, 143-149.

**Baudino, T. A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J. A., Maclean, K. H., White, E. L., Davis, A. C., Ihle, J. N. & Cleveland, J. L.** (2002): c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 16, 2530-2543.

**Bauer, A., Huber, O. & Kemler, R.** (1998): Pontin52, an interaction partner of  $\beta$ -catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14787-14792.

**Behrens, J., Mareel, M. M., van Roy, F. M. & Birchmeier, W.** (1989): Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108, 2435-2447.

**Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., van Roy, F., Mareel, M. M. & Birchmeier, W.** (1993): Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J. Cell Biol.* 120, 757-766.

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

**Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. & Birchmeier, W.** (1998): Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596-599.

**Bell, L. A. & Ryan, K. M.** (2004): Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ.* 11, 137-142.

**Ben-Av, P., Crofford, L. J., Wilder, R. L. & Hla, T.** (1995): Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: A potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Letters* 372, 83-87.

**Berger, D. P., Herbstritt, L., Dengler, W. A., Marme, D., Mertelsmann, R. & Fiebig, H. H.** (1995): Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann. Oncol.* 6, 817-825.

**Berns, K., Hijmans, E. M. & Bernards, R.** (1997): Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene* 15, 1347-1356.

**Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J.** (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

**Besson, A., Assoian, R. K. & Roberts, J. M.** (2004) : Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 4, 948-955.

**Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. & Nusse, R.** (1996): A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.

**Bhardwaj, S., Roy, H., Gruchala, M., Viita, H., Kholova, I., Kokina, I., Achen, M. G., Stacker, S. A., Hedman, M., Alitalo, K. & Yla-Herttuala, S.** (2003): Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Human Gene Ther.* 14, 1451-1462.

**Bienvenu, F., Gascan, H. & Coqueret, O.** (2001) : Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 16840-16847.

**Bienz, M.** (2002): The subcellular destinations of APC proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 328-338.

**Binnerts, M. E., Kim, K. A., Bright, J. M., Patel, S. M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J. M., Liu, Y., Lomas, W. E., 3<sup>rd</sup> & Dixon, M. et al.** (2007): R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14700-14705.

- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G. F.** (2003): Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S.** (2005): Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Med.* 11, 50-55.
- Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N.** (1991): Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Bloom, J. & Pagano, M.** (2003): Deregulated degradation of the CDK inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41-47.
- Bos, J. L.** (1989): Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. & Eilers, M.** (1999): Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.* 18, 5321-5333.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. & Kirchner, T.** (1999): beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Path.* 155, 1033-1038.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., Knuechel, R. & Kirchner, T.** (2001): Variable  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10356-10361.
- Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D. & Moon, R. T.** (1999): XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development* 126, 3159-3170.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. & Brattain, D.E.** (1981): Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41 (5), 1751-1756.

**Brembeck, F. H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M. & Birchmeier, W.** (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between  $\beta$ -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* 18, 2225-2230.

**Brembeck, F. H., Rosário, M. & Birchmeier, W.** (2006): Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51-59.

**Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P. G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L. & Fuks, F.** (2005): Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24, 336-346.

**Bromberg, J., Wrzeszczynska, M., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R., Albanese, C. & Darnell, J.** (1999): Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.

**Bryja, V., Gradl, D., Schambony, A., Arenas, E. & Schulte, G.** (2007): Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6690-6695.

**Carmeliet, P. & Jain, R. K.** (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

**Castro-Rivera, E., Samudio, I. & Safe, S.** (2001): Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J. Biol. Chem.* 276, 30853.

**Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Pfeifer, M., Bejsovec, A.** (1998): Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.

**Check, E.** (2005): A crucial test. *Nature Med.* 11, 243-244.



- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. & Courney, A. J.** (1999a): A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218-2230.
- Chen, Y. T., Stewart, D. B. & Nelson, W. J.** (1999b): Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cell. *J. Cell Biol.* 144, 687-699.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. & Walz, T.** (2004): Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 116, 565-576.
- Chinnadurai, G.** (2002): CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol. Cell* 9, 213-224.
- Choi, H. J., Huber, A. H. & Weis, W. I.** (2006): Thermodynamics of  $\beta$ -catenin-ligand interactions. The roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J. Biol. Chem.* 281, 1027-1038.
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. & Golub, T. R.** (2000): Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3260-3265.
- Coqueret, O.** (2002): Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35-55.
- Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D. & Kroemer, G.** (2000): Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1042-1053.
- Cowin, P., Kapprell, H. P., Franke, W. W., Tamkun, J. & Hynes, R. O.** (1986): Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 46, 1063-1073.
- Clevers, H.** (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

**Cong, F., Schweizer, L. & Varmus, H.** (2004): Casein kinase I epsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Mol. Cell Biol.* 24, 2000-2011.

**Cong, F. & Varmus, H.** (2004): Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2882-2887.

**Cox, E. A. & Hardin, J.** (2004): Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* 117, 1885-1897.

**Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E., Wonsey, D. & Zeller, K.** (1999): Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell. Res.* 253, 63-77.

**Dang, C. V.** (1999): c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1-11.

**Daniels, D. L. & Weis, W. I.** (2005): Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364-371.

**Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G. & Penichet, M. L.** (2006): The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* 121, 144-158.

**Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A. & Niehrs, C.** (2005): Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867-872.

**Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. & Bradley, A.** (1993): A null *c-myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* 7, 671-682.

**Debbas, M. & White, E.** (1993): Wild-type 53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7, 546-554.

**Der, C. J., Finkel, T. & Cooper, G. M.** (1986): Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44, 167-176.

**Desbiens, K. M., Deschesnes, R. G., Labrie, M. M., Desfossés, Y., Lambert, H., Landry, J. & Bellman, K.** (2003): c-Myc potentiates the mitochondrial pathway of apoptosis by acting upstream of apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) in the p38 signalling cascade. *Biochem. J.* 372 (Pt2), 631-641.

**Desagher, S. & Martinou, J. C.** (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377.

**De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. & Williams, L. T.** (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.

**Diehl, J. A., Zindy, F. & Sherr, C. J.** (1997): Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 957-972.

**Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J.** (1998): Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511.

**Dotto, G. P.** (2003): p21WAF1/Cip1: more than a break to the cell cycle? *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M43-M56.

**Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M. & Peters, G.** (2003): Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell* 4, 301-310.

**Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. & Weis, W. I.** (2005):  $\alpha$ -Catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903-915.

**Dufourny, B., van Teeffelen, I. H., Hamelers, J. S., Sussenbach, P. H. & Steenbergh, J.** (2000): Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 166, 329.

**Dyxhoorn, D. M., Novina, C. D. & Sharp, P. A.** (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457-467.

**Dyson, N.** (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.

**Easwaran, V., Lee, S. H., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garret, E., Wiesmann, M., Garcia, P. D., Fuller, J. H., Chan, V., Randezzo, F., Gundel, R., Warren, R. S., Escobedo, J., Aukerman, S. L., Taylor, R. N. & Fantl, W. J.** (2003):  $\beta$ -Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 63, 3145-3153.

**Eferl, R. & Wagner, E. F.** (2003): AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859-868.

**Egginton, S., Zhou, A. L., Brown, M. D. & Hudlicka, O.** (2001): Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc. Res.* 49, 634-646.

**Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P. & Cory, S.** (2004): Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6164-6169.

**Ehrlich, J. S., Hansen, M. D. & Nelson, W. J.** (2002): Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell-adhesion. *Dev. Cell* 3, 259-270.

**Eilers, M., Schirm, S. & Bishop, J. M.** (1991): The MYC protein activates transcription of the  $\alpha$ -prothymosin gene. *EMBO J.* 10, 133-141.

**Eilers, M.** (1999): Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol. Cells.* 9, 1-6.

- Eischen, C. M., Woo, D., Roussel, M. F. & Cleveland, J. L.** (2001): Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X<sub>L</sub> or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5063-5070.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T.** (2001a): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T.** (2001b): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Eming, S. A. & Krieg, T.** (2006): Molecular mechanism of VEGF-A action during tissue repair. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 11, 79-86.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. & Hancock, D. C.** (1992): Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I. & Dickson, C.** (1995): Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* 9, 2364-2372.
- Felsher, D. W. & Bishop, J. M.** (1999): Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3940-3944.
- Ferrara, N. & Henzel, J. H.** (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. & Moore, M. W.** (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

**Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J.** (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

**Flemington, E. K., Speck, S. H. & Kaelin, W. G. Jr.** (1993): E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6914-6918.

**Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L.** (1995): The role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.

**Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D.,** (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604-4613.

**Freeman, R. S., Estus, S. & Johnson, E. M. Jr.** (1994): Analysis of cell cycle-related gene expression in post-mitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12, 343-355.

**Freytag, S. O. & Geddes, T. J.** (1992): Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP $\alpha$ . *Science* 256, 379-382.

**Frye, M., Gardner, C., Li, E. R., Arnold, I. & Watt, F. M.** (2003): Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130, 2793-2808.

**Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T. & Birchmeier, W.** (2002): Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 222-231.

- Fujiwara, T., Stolker, J. M., Watanabe, T., Rashid, A., Longo, P., Eshleman, J. R., Booker, S., Lynch, H. T., Jass, J. R., Green, J. S., Kim, H., Vogelstein, B. & Hamilton, S. R.** (1998): Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* 153, 1063-1078.
- Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. & Tyner, A. L.** (2001): Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4510-4515.
- Gatenby, R. A. & Gawlinski, E. T.** (1996): A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res.* 56, 5745-5753.
- Gatenby, R. A. & Gillies, R. J.** (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891-899.
- Gatter, K. C., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woolston, R. E. & Mason, D. Y.** (1983): Transferrin receptors in human tissue: their distribution and possible clinical relevance. *J. Clin. Pathol.* 36, 539-545.
- Geng, Y., Eaton, E. N., Picon, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C. & Weinberg, R. A.** (1996): Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12, 1173-1180.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. & Grosschedl, R.** (1995): Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 9, 995-1008.
- Giles, R.H., van Es, J.H. & Clevers, H.** (2003): Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1653, 1-24.

**Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. & Bouck, N. P.** (1990): A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6624-6628.

**Gordan, J. D. & Simon, M. C.** (2007): Hypoxia-inducible factors: Central regulators of the tumor phenotype. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 17, 71-77.

**Gonzalez-Sancho, J. M., Brennan, K. R., Castelo-Soccio, L. A. & Brown, A. M.** (2004): Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6-independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4757-4768.

**Gottardi, C. J., Wong, E. & Gumbiner, B. M.** (2001): E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting  $\beta$ -catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153, 1049-1060.

**Green, D. R. & Reed, J. C.** (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

**Gregory, M. A., Qi, Y. & Hann, S. R.** (2003): Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J. Biol. Chem.* 278, 51606-51612.

**Grosschedl, R., Giese, K. & Pagel, J.** (1994): HMG domain proteins: Architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94-100.

**Grumont, R. J., Strasser, A. & Gerondakis, S.** (2002): B cell growth is controlled by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent induction of Rel/NF- $\kappa$ B regulated c-myc transcription. *Mol. Cell* 10 (6), 1283-1294.

**Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P. Y. & Hebbel, R. P.** (1999): VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp. Cell Res.* 247, 495-504.



- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S. Jr** (1999): NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5785-5799.
- Ha, N. C., Tonzuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J. & Weis, W. I.** (2004): Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol. Cell* 15, 511-521.
- Hall, A.** (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Han, E. K.-H., Begemann, M., Sgambato, A.,** (1996): Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27<sup>kip1</sup>, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Diff.* 7, 699-710.
- Han, E. K.-H., Ng, S.-C., Arber, N., Begeman, M. & Weinstein, I. B.** (1999): Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis* 4, 213-219.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A.** (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. & Dean, D. C.** (1999): Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869.
- Harbour, J. W. & Dean, D. C.** (2000): The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393-2409.
- Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B. & Polakis, P.** (1998): Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* 8, 573-581.
- Hay, E. D.** (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154, 8-20.

**Hayat, M. A.** (2002): *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

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

**Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F. & Kemler, R.** (2000): The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19, 1839-1850.

**Helin, K., Harlow, E. & Fattaey, A.** (1993): Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6501-6508.

**Hermeking, H., Rago, C., Schumacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W.** (2000): Identification of CDK4 as target of c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2229-2234.

**Hesser, B. A., Liang, X. H., Camenisch, G., Yang, S., Lewin, D. A., Scheller, R., Ferrara, N. & Gerber, H. P.** (2004): Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood* 104, 149-158.

**Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. & Nelson, W. J.** (1994): Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* 125, 1327,1340.

**Hino, S., Michiue, T., Asashima, M. & Kikuchi, A.** (2003): Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 278, 14066-14073.

**Hirokawa, N., Keller, T. C. third, Chasan, R. & Mooseker, M. S.** (1983): Mechanism of brush border contractility studied by the quick-freeze, deep-etch method. *J. Cell Biol.* 96, 1325-1336.

**Ho, Q. T. & Kuo, C. J.** (2007): Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1349-1357.

**Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C.** (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

**Holness, M. J. & Sudgeon, M. C.** (2003): Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1143-1151.

**Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. & Hartmann, G.** (2005): Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR6. *Nature Med.* 11, 263-270.

**Hosokawa, Y. & Arnold, A.** (1998): Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 66-71.

**Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. & Ferrara, N.** (1992): Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031-26037.

**Huber, A. H. & Weis, W. I.** (2001): The structure of  $\beta$ -catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by  $\beta$ -catenin. *Cell* 105, 391-402.

**Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J. & Weis, W. I.** (2001): The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J. Biol. Chem.* 276, 12301-12309.

**Hutvagner, G. & Zamore, P. D.** (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

**Iavarone, C., Catania, A., Marinissen, M. J., Visconti, R., Acunzo, M., Tarantino, C., Carlomagno, M. S., Bruni, C. B., Gutkind, J. S. & Chiariello, M.** (2003): The platelet-derived growth factor controls c-myc expression through a JNK- and AP-1-dependent signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 50024-50030.

**Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. & Kikuchi, A.** (1998): Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and beta-catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 17,1371-1384.

**Inoue, K. & Sherr, C. J.** (1998): Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1590-1600.

**Iritani, B. M. & Eisenman, R. N.** (1999): c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13180-13185.

**James, L. & Eisenman, R. N.** (2002): Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10429-10434.

**Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C., Freund, J.-N. & Costantini, F.** (2002): Wnt/ $\beta$ -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin 2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172-1183.

**Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. & Gallant, P.** (1999): *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell* 98, 779-790.

**Jones, T. R. & Cole, M. D.** (1987): Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: Requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4513-4521.

**Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., Der, C. J. & Pestell, R. G.** (1999): Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 25245.

**Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. & MacLachlan, I. (2005):** Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnol.* 23, 457-462.

**Juin, P., Hueber, A. O., Littlewood, T. & Evan, G. (1999) :** c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev.* 13, 1367-1381.

**Kamba, T., Tam, B. Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M. R., Norberg, S. M., O'Brien, S. M., Davis, R. B., Gowen, L. C., Anderson, K. D., Thurston, G., Joho, S., Springer, M. L., Kuo, C. J. & McDonald, D. M. (2006):** VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2), H560-H576.

**Kamei, J., Toyofuku, T. & Hori, M. (2003):** Negative regulation of p21 by  $\beta$ -Catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312, 380-387.

**Katoh, O., Takahashi, T., Oguri, T., Kuramoto, K., Mihara, K., Kobayashi, M., Hirata, S. & Watanabe, H. (1998):** Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res.* 58, 5565-5569.

**Kawasaki, H. & Taira, K. (2003):** Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA<sup>Val</sup> promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 700-707.

**Keller, J. W., Franklin, J. L., Graves-Deal, R., Friedman, D. B., Whitwell, C. W. & Coffey, R. J. (2007):** Oncogenic *KRAS* provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell. Physiol.* 210, 740-749.

**Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D. & Leder, P. (1983):** Cell-specific regulation of the *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603-610.

**Kemler, R.** (1993): From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.

**Kerkhoff, E., Houben, R., Loffler, S., Troppmair, J., Lee, J. E. & Rapp, U. R.** (1998): Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene* 16, 211-216.

**Khan, Z., Vijayakumar, S., de la Torre, T., Rotolo, S. & Bafico, A.** (2007): Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7291-7301.

**Kikuchi, A., Kishida, S. & Yamamoto, H.** (2006): Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp. Mol. Med.* 38, 1-10.

**Kim, J.-W., Zeller, K. I., Wang, Y., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A. & Dang, C. V.** (2004a): Evaluation of Myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5923-5936.

**Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E. & Rossi, J. J.** (2004b): Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nature Biotechnol.* 22, 321-325.

**Kim, D. H. & Rossi, J. J.** (2007): Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 8, 173-184.

**Kim, J. W. & Dang, C. V.** (2006): Cancers's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 66, 8927-8930.

**Kim, J. W., Gao, P. & Dang, C. V.** (2007): Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 291-298.

**Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. I. & Dang, C. V.** (2006): HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177-185.

**King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. & Kirschner, M. W.** (1996): How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.

**Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S. & Kikuchi, A.** (1998): Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 10823-10826.

**Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M. & Kishida, A.** (1999): DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol. Cell. Biol.* 19,, 4414-4422.

**Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M. & Hirano, T.** (1999): STAT3 is required for the gp 130-mediate full activation of the c-myc gene. *J. Exp. Med.* 189, 63-73.

**Klagsbrun, M., Takashima, S. & Mamluk, R.** (2002): The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 33-48.

**Knudsen, K. E., Cavenee, W. K. & Arden, K. C.** (1999): D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res.* 59, 2297-2301.

**Kobielak, A. & Fuchs, E.** (2004): Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 614-625.

**Kobielak, A., Pasolli, H. A. & Fuchs, E.** (2004): Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.*, 6, 21-30.

**Koepp, D. M., Harper, J. W. & Elledge, S. J.** (1999): How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431-434.

**Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S. & Basler, K.** (2002): Wnt/Wingless signaling requires BCL9/Legless-mediated recruitment of Pygopus to the nuclear  $\beta$ -catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47-60.

**Kranenburg, O., van der Eb, A. J. & Zantema, A.** (1996): Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 15, 46-54.

**Kühl, M.** (2004): The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front. Biosci* 9, 967-974.

**Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

**Lahti, J. M., Li, H. & Kidd, V. J.** (1997): Elimination of cyclin D1 in vertebrate cells leads to an altered cell cycle phenotype, which is rescued by overexpression of murine cyclins D1, D2 or D3 but not by a mutant cyclin D1. *J. Biol. Chem.* 272, 10859-10869.

**Lamb, J., Ladha, M. H., McMahon, C., Sutherland, R. L. & Ewen, M. E.** (2000): Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8667.

**Lamb, J., Ramaswamy, S., Ford, H. L., Contreras, B., Martinez, R. V., Kittrell, F. S., Zahnow, C. A., Patterson, N., Golub, T. R. & Ewen, M. E.** (2003): A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 114, 323.

**Land, H., Parada, L. F. & Weinberg, R. A.** (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

**La Thangue, N. B.** (2003): The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. *Nat. Cell Biol.* 5, 587-589.

**Laurent-Puig, P., Beroud, C. & Soussi, T.** (1998): APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 26, 269-270.



- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. & Pouyssegur, J.** (1996) : Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 20608-20616.
- Le Cam, L., Polanowska, J., Fabbriozio, E., Olivier, M., Philips, A., Ng Eaton, E., Classon, M., Geng, Y. & Sardet, C.** (1999): Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *EMBO J.* 18, 1878-1890.
- Lee, E., Salic, A. & Kirschner, M. W.** (2001): Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J. Cell Biol.* 154 (5), 983-993.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D. & Iruela-Arispe, M. L.** (2005): Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* 169, 681-691.
- Lee, L. A. & Dang, C. V.** (2006): Myc Target Transcriptomes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 145-167.
- Lee, S. & Helfman, D. M.** (2003): Cytoplasmic p21<sup>Cip1</sup> is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 1885-1891.
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K. P. & Iruela-Arispe, M. L.** (2007): Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130, 691-703.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C. & Mabry, N. D.** (1976): Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36, 4562-4569.
- Leung, J. Y., Kolligs, F. T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R. & Fearon, E. R.** (2002): Activation of *AXIN2* Expression by  $\beta$ -Catenin-T Cell Factor. *J. Biol. Chem.* 277, 21657-21665.

**Levine, A. J., Momand, J. & Finley, C. A.** (1991): The *p53* tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.

**Li, Z., Wang, C., Jiao, X., Lu, Y., Fu, M., Quong, A. A., Dye, C., Yang, J., Dai, M., Ju, X., Zhang, X., Li, A., Burbelo, P., Stanley, E. R. & Pestell, R. G.** (2006a): Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of Thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4240-4256.

**Li, Z., Jiao, X., Wang, C., Ju, X., Lu, Y., Yuan, L., Lisanti, M. P., Katiyar, S. & Pestell, R. G.** (2006b): Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27<sup>KIP1</sup>. *Cancer Res.* 66, 9986-9994.

**Lickert, H., Bauer, A., Kemler, R. & Stappert, J.** (2000): Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 275, 5090-5095.

**Lilien, J. & Balsamico, J.** (2005): The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of  $\beta$ -catenin. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17, 459-495.

**Lin, H. M., Zhao, L. & Cheng, S. Y.** (2002): Cyclin D1 is a ligand-independent co-repressor for thyroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 28733-28741.

**Liu, W., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhan, Z., Lin, X. & He, X.** (2002): Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.

**Liu, M. C., Marshall, J. L. & Pestell, R. G.** (2004): Novel strategies in cancer therapeutics: targeting enzymes involved in cell cycle regulation and cellular proliferation. *Curr. Cancer Targets* 4, 403-424.

**Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Logan, C. Y. & Nusse, R.** (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Louro, I. D., Bailey, E. C., Li, X., South, L. S., McKie-Bell, P. R., Yoder, B. K., Huang, C. C., Johnson, M. R., Hill, A. E., Johnson, R. L. & Ruppert, J. M.** (2002): Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation. *Cancer Res.* 62 (20), 5867-5873.
- Luscher, B. & Eisenman, R. N.** (1990): New light on Myc and Myb. Part 1. *Myc. Genes Dev.* 4, 2025-2035.
- Lustig, B. & Behrens, J.** (2003): The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129 (4), 199-221.
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C. & Mathews, M. B.** (1992): Interaction between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5238-5248.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. & Niehrs, C.** (2001): LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-325.
- Margineantu, D. H., Gregory Cox, W., Sundell, L., Sherwood, S. W., Beechem, J. M. & Capaldi, R. A.** (2002): Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1, 425-435.
- Marques, J. T., Devosse, T., Wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., Fujita, T., Behlke, M. A. & Williams, B. R.** (2006) : A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 24, 559-565.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. & Zamore, P. D.** (2005): Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into AGO2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.

- Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G. & Kanakura, Y.** (1999): Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J.* 18, 1367-1377.
- Matsuoka, M., Kato, J. Y., Fisher, R. P., Morgan, D. O. & Sherr, C. J.** (1994): Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7265-7275.
- Matsushime, H., Roussel, M. F. Ashmun, R. A. & Sherr, C. J.** (1991): Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65, 701-713.
- McAllister, S. S., Becker-Hapak, M., Pintucci, G., Pagano, M. & Dowdy, S.** (2003): Novel p27<sup>Kip1</sup> C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol. Cell. Biol.* 23, 216-228.
- McCrea, P. D., Turck, C. W. & Gumbiner, B.** (1991): A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 354, 1359-1361.
- McFarland, T. J., Zhang, Y., Appukuttan, B. & Stout, J. T.** (2004): Gene therapy for proliferative ocular diseases. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4, 1053-1058.
- Menssen, A. & Hermeking, H.** (2002): Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6274-6279.
- Mikels, A. J. & Nusse, R.** (2006): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
- Mirza, A., Wu, Q., Wang, L., McClanahan, T., Bishop, W. R., Gheyas, F., Ding, W., Hutchins, B., Hockenberry, T., Kirschmeier, P., Greene, J. R. & Liu, S.** (2003): Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene* 22, 3645-3654.

**Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C. & El-Deiry, W. S.** (2000): *Bax* is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 6318-6325.

**Mole, D. R., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J.** (2001): Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor, implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life* 52, 43-47.

**Morata, G. & Lawrence, P. A.** (1977): The development of *wingless*, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 56, 227-240.

**Morgan, D. O.** (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.

**Morgan, D. O.** (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291.

**Mosimann, C., Hausmann, G. & Basler, K.** (2006): Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell* 125, 327-341.

**Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Juppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. & Arnold, A.** (1991): A novel cyclin encoded by a *bc11*-linked candidate oncogene. *Nature* 350, 512-515.

**Munzel, P., Marx, D., Kochel, H., Schauer, A. & Bock, K. W.** (1991): Genomic alterations of the c-myc protooncogene in relation to the overexpression of c-erbB2 and Ki-67 in human breast and cervix carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117, 603-607.

**Nair, S. K. & Burley, S. K.** (2003): X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112, 193-205.

**Neri, A., Knowles, D. M., Greco, A., McCormick, F. & Dalla-Favera, R.** (1988): Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9268-9272.

**Nesbit, C. E., Tersak, J. M. & Prochownik, E. V.** (1999): MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.

**Neufeld, G., Cohen, T., Genginovitch, S. & Poltrok, Z.** (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.

**Neuman, E., Ladha, M. H., Lin, N., Upton, T. M., Miller, S. J., DiRenzo, J., Pestell, R. G., Hinds, P. W., Dowdy, S. F., Brown, M. & Ewen, M. E.** (1997): Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of Cdk4. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5338-5347.

**Neumeister, P., Pixley, F. J., Xiong, Y., Xie, H., Wu, K., Ashton, A., Cammer, M., Chan, A., Symons, M., Stanley, E. R. & Pestell, R. G.** (2003): Cyclin d1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol. Biol. Cell.* 14, 2005-2014.

**Nollet, F., Kools, P. & van Roy, F.** (2000): Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299, 551-572.

**Nor, J. E., Christensen, J., Mooney, D. J. & Polverini, P. J.** (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Amer. J. Pathol.* 154, 375-384.

**Nurse, P.** (2000): A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.

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

**Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K. & Varmus, H.** (1984): Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 307, 131-136.

**Nusse, R.** (2005): Cell biology: relays at the membrane. *Nature* 438, 747-749.

**Nykanen, A., Haley, B. & Zamore, P. D.** (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

**O'Donnell, K. A., Yu, D., Zeller, K. I., Kim, J., Racke, F., Thomas-Tikhonenko, A. & Dang, C. V.** (2006): Activation of Transferrin Receptor 1 by c-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2372-2386.

**O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G. Jr. & DePinho, R. A.** (2000a): Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev.* 14, 2185-2191.

**O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C., Meltzer, P. & DePinho, R. A.** (2000b): Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat. Genet.* 24 (2), 113-119.

**Ohtani, K., DeGregori, J. & Nevins, J. R.** (1995): Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12146-12150.

**Okamoto, K. & Shaw, J. M.** (2005): Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39, 503-536.

**Opitz, O. G. & Rustgi, A. K.** (2000): Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res.* 60, 2825-2830.

**Orban, T. I. & Izaurralde, E.** (2005): Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459-469.

**Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. & Kemler, R.** (1999): E-cadherin binding prevents  $\beta$ -catenin nuclear localization and  $\beta$ -catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* 112, 1237-1245.

**Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M.,** (2000): Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797-21800.

**Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R.** (1989): The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711-1717.

**Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C.** (2006) : HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabol.* 3, 187-197.

**Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G.** (2002a): c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 764-776.

**Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G.** (2002b): Suppression of Myc-induced apoptosis in  $\beta$  cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.

**Pelengaris, S. & Khan, M.** (2003): The many faces of c-MYC. *Arch. Biochem. Biophys.* 416, 129-136.

**Pendergrass, W., Wolf, N. & Poot, M.** (2004): Efficacy of MitoTracker Green<sup>TM</sup> and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry Part A* 61A: 162-169.

**Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A. & Land, H.** (1999): Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27 (Kip1) and p21 (Cip1). *EMBO J.* 18, 5310-5320.



- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. & Christofori, G.** (1998): A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
- Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. & Graff, J. M.** (1999): Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* 401, 345-350.
- Petre, C. E., Wetherill, Y. B., Danielsen, M. & Knudsen, K. E.** (2002): Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J. Biol. Chem.* 277, 2207-2215.
- Philipp-Staheli, J., Payne, S. R. & Kemp, C. J.** (2001): p27<sup>Kip1</sup>: regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp. Cell Res.* 264, 148-168.
- Pidgeon, G. P., Barr, M. P., Harmey, J. H., Foley, D. A. & Bouchier-Hayes, D. J.** (2001): Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br. J. Cancer* 85, 273-278.
- Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A. & Dunach, M.** (2003): p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate  $\beta$ -catenin Tyr-142 phosphorylation and  $\beta$ -catenin- $\alpha$ -catenin interaction. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2287-2297.
- Pitre, A., Pan, Y., Pruett, S. & Skalli, O.** (2006): On the use of ratio standard curves to accurately quantitate relative changes in protein levels by Western blot. *Anal. Biochem.* 361, 305-307.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. & Skarnes, W. C.** (2000): An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-538.
- Pokutta, S. & Weis, W. I.** (2007): Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 237-261.

**Polakis, P.** (1997): The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1332, F127-F147.

**Polakis, P.** (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837-1851.

**Pollard, T. D. & Borisy, G. G.** (2003): Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

**Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.** (1997): A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

**Ponzielli, R., Katz, S., Barsyte-Lovejoy, D. & Penn, L. Z.** (2005): Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. *Eur. J. Cancer* 41, 2485-2501.

**Potten, C.S. & Loeffler, M.** (1990): Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 10001-1020.

**Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.** (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237.

**Price, M.A.** (2006): CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev.* 20, 399-410.

**Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X.** (2005): Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.

**Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R.** (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3116-3120.

**Richardson, D. R.** (2002): Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 267-281.

- Rijsewik, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. & Nusse, R.** (1987): The *Drosophila* Homolog of the Mouse Mammary Oncogene *int-1* is Identical to the Segment Polarity Gene *wingless*. *Cell* 50, 649-657.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. & Morrow, J. S.** (1995):  $\alpha_1$ (E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8813-8817.
- Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M. I., Kholova, I., Kauppinen, R. A., Achen, M. G., Stacker, S. A., Alitalo, K. & Ylä-Herttuala, S.** (2003): VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* 92, 1098-1106.
- Rissanen, T. T., Rutanen, J. & Ylä-Herttuala, S.** (2004): Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia. *Adv. Genet.* 52, 117-164.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. & Clevers, H.** (1998): The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-612.
- Roose, J. & Clevers, H.** (1999): TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 87456, M23-M37.
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F. & Bienz, M.** (2000): The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406, 1009-1012.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A. & Dunach, M.** (1999): Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 36734-36740.
- Roy, H., Bhardwaj, S. & Ylä-Herttuala, S.** (2006): Biology of vascular endothelial growth factor. *FEBS Letters* 580, 2879-2887.

**Russel, A., Thompson, M. A., Hendley, J., Trute, L., Armes, J. & Germain, D. (1999):** Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 18, 1983-1991.

**Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J. & Redeuilh, G. (1999) :** Estrogen induction of the cyclin D1 promoter : involvement of a cAMP response-like element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11217-11222.

**Sakamaki, T., Casimiro, M. C., Ju, X., Quong, A. A., Katiyar, S., Liu, M., Jiao, X., Li, A., Zhang, A., Lu, Y., Wang, J., Byers, S., Nicholson, R., Link, T., Shemluck, M., Yang, J., Fricke, S. T., Novikoff, P. M., Papanikolaou, A., Arnold, A., Albanese, C. & Pestell, R. (2006):** Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5449-5469.

**Sancho, E., Battle, E. & Clevers, H. (2003):** Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 763-770.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

**Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R. & Winston, D. J. (2004):** Loss of APC in vivo immediately perturbs Wnt signalling, differentiation and migration. *Genes Dev.* 18, 1385-1390.

**Sansom, O. J., Reed, K. R., van de Wetering, M., Muncan, V., Winston, D. J., Clevers, H. & Clarke, A. R. (2005):** Cyclin D1 is not an immediate target of  $\beta$ -catenin following Apc loss in the intestine. *J. Biol. Chem.* 280, 28463-28467.

**Sansom, O. J., Meniel, V. S., Muncan, V., Phesse, T. J., Wilkins, J. A., Reed, K. R., Vass, J. K., Athineos, D., Clevers, H. & Clarke, A. R. (2007):** *Myc* deletion rescues AC deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676-679.

**Schagbauer-Wadl, H., Griffioen, M., van Elsas, A., Schrier, P. I., Pustelnik, T., Eichler, H. G., Wolff, K., Pehamberger, H. & Jansen, B. (1999):** Influence of increased c-Myc expression on the growth characteristics of human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 112, 332-336.

**Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. (1953):** Studies in the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97 (5), 695-710.

**Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999):** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.

**Schneikert, J. & Behrens, J. (2007):** The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 56 (3), 417-425.

**Schornack, P. A. & Gillies, R. J. (2003):** Contributions of cell metabolism and H<sup>+</sup> diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* 5, 135-145.

**Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. (2002):** Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537-548.

**Sears, R., Leone, G., DeGregori, J. & Nevins, J. R. (1999):** Ras enhances Myc protein stability. *Mol. Cell* 3, 169-179.

**Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K. & Nevins, J. R. (2000):** Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501-2514.

**Seeburg, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goedel, D. V. & Levinson, A. D. (1984):** Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature (London)* 312, 71-75.

- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L.** (1994): Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol. Chem.* 269, 23757-23763.
- Semenza, G. L., Shimoda, L. A. & Prabhakar, N. R.** (2006): Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Foundation Symposium* 272, 2-8; discussion 8-14, 33-36.
- Seth, R. B., Sun, L. & Chen, Z. J.** (2006): Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 16, 141-147.
- Shachaf, C. M. & Felsher, D. W.** (2005): Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. *TRENDS Mol. Med.* 11 (7), 316-321.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr.** (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.
- Sharma, R.P.** (1973): *wingless*, a new mutant in *D. melanogaster*. *Dros. Inf. Service* 50, 134.
- Sharma, R. P. & Chopra, V. L.** (1976): Effect of *wingless* (*wgl*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 48, 461-465.
- Sherr, C. J.** (1996): Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M.** (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A.,** (1997): c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6658-6663.

**Shiozawa, T., Miyamoto, T., Kashima, H., Nakayama, K., Nikaido, T. & Konishi, I.** (2004): Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene* 23, 8603-8610.

**Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. & Ben-Ze'ev, A.** (1999): The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5522-5527.

**Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J. & Weinberg, R. A.** (1995): Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-630.

**Slingerland, J. & Pagano, M.** (2000): Regulation of the CDK inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell. Physiol.* 183, 10-17.

**Smith, K.J., Johnson, K.A., Bryan, T.M., Hill, D.E., Markowitz, S., Willson, J.K., Paraskeva, C., Petersen, G.M., Hamilton, S.R. & Vogelstein, B., et al.** (1993): The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (7), 2846-2850.

**Sofer-Levi, Y. & Resnitzky, D.** (1996): Apoptosis induced by ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E. *Oncogene* 13, 2431-2437.

**Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. & Klagsbrun, M.** (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.

**Soucie, E. L., Annis, M. G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D. W. & Penn, L. Z.** (2001): Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4725-4736.

**Spyridopoulos, I., Brogi, E., Kearney, M., Sullivan, A. B., Cetrulo, C., Isner, J. M. & Losordo, D. W.** (1997): Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ : Balance between growth and death signals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 291, 1321-1330.

**Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J., Hänel, F. & Eilers, M.** (2001): Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat. Cell Biol.* 3, 392-399.

**Städeli, R. & Basler, K.** (2005): Dissecting nuclear Wingless signalling: Recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech. Dev.* 122, 1171-1182.

**Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J. & Eilers, M.** (1995): Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 14, 4814-1426.

**Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H. & Foisner, R.** (2001): E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *J. Cell Biol.* 154, 1185-1196.

**Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T. & Takada, S.** (2006): Mono-unsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791-801.

**Takeichi, M.** (1995): Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7, 619-627.

**Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. & He, X.** (2000): LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.

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



**Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K. & Paavonen, K.** (2005): The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 550-563.

**Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H. & Tohyama, M.** (2002): Cytoplasmic p21<sup>Cip1/Waf1</sup> regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell Biol.* 158, 321-329.

**Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. & Böhlen, P.** (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579-1586.

**Tetsu, O. & McCormick, F.** (1999):  $\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

**Thiery, J. P.** (2002): Epithelial-mesenchymal transition in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-454.

**Tikhonenko, A. T., Black, D. J. & Linial, M. L.** (1996): Viral Myc oncoproteins in infected fibroblasts down-modulate thrombospondin-1, a possible tumor suppressor gene. *J. Biol. Chem.* 271 (48), 30741-30747.

**Tolwinski, N. S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., diNardo, S. & Wieschaus, E.** (2003): Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3 $\beta$  activity. *Dev. Cell* 4 (3), 407-418.

**Tomeo, C.A., Colditz, G.A., Willet, W.C., Giovannucci, E., Platz, E., Rockhill, B., Dart, H. & Hunter, D.J.** (1999): Harvard Report on Cancer Prevention. Volume 3: prevention of colon cancer in the United States. *Cancer Causes Control* 10, 167-180.

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

**Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V. & Fuchs, E. (2002):** Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev. Cell* 3, 367-381.

**van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V. & Clevers, H. (1996):** Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell. Biol.* 16, 745-752.

**van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Huristone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.-P., Tjong-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. & Clevers, H. (2002):** The  $\beta$ -Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

**van Noort, M. & Clevers, H. (2002):** TCF Transcription Factors, Mediators of Wnt-Signalling in Development and Cancer. *Dev. Biol.* 255, 1-8.

**van Noort, M., Meedlijk, J., van der Zee, R., Destree, O. & Clevers, H. (2002):** Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 277, 17901-17905.

**van Ooyen, A., Kwee, V. & Nusse, R. (1985):** The nucleotide sequence of the human *int-1* mammary oncogene; evolutionary conservation of coding and noncoding sequences. *EMBO J.* 4, 2905-2909.

**Veeman, M. T., Axelrod, J. D. & Moon, R. T. (2003):** A second canon: Functions and mechanisms of  $\beta$ -Catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377.

**Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. & Bishop, J. M. (1982):** Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogen (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain. *J. Virol.* 42, 773-779.

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

**Vleminckx, K., Vakaet, L. Jr., Mareel, M., Fiers, W. & van Roy, F.** (1991): Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.

**Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J.** (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

**Volpert, O. V., Pili, R., Sikder, H. A., Nelius, T., Zaichuk, T., Morris, C., Shiflett, C. B., Devlin, M. K., Conant, K. & Alani, M. K.** (2002): Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2, 473-483.

**Wallace, D. C.** (2005): A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.

**Wang, G. L. & Semenza, G. L.** (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4304-4308.

**Wang, C., Pattabiraman, N., Zhou, J. N., Fu, M., Sakamaki, T., Albanese, C., Li, Z., Wu, K., Hult, J., Neumeister, P., Novikoff, P. M., Brownlee, M., Scherer, P. E., Jones, J. G., Whitney, K. D., Donehower, L. A., Harris, E. L., Rohan, T., Johns, D. C. & Pestell, R. G.** (2003): Cyclin D1 repression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6159-6173.

**Warburg, O.** (1956a): On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

**Warburg, O.** (1956b): On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.

**Watanabe, Y. & Dvorak, H. F.** (1997): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. *Exp. Cell Res.* 233, 340-349.

**Watnick, R. S., Cheng, Y. N., Rangarajan, A., Ince, T. A. & Weinberg, R. A.** (2003): Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumour angiogenesis. *Cancer Cell* 3, 219-231.

**Webster, M.T., Rozycka, M., Sara, E., Davies, E., Smalley, M., Young, N., Dale, T.C. & Wooster, R.** (2000): Sequence variant of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 443-453.

**Wei, W., Jobling, W. A., Chen, W., Hahn, W. C. & Sedivy, J. M.** (2003): Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>Ink4a</sup> and p21<sup>Cip1/Waf1</sup> functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2859-2870.

**Wei, Q., Yokota, C., Semenov, M. V., Doble, B., Woodgett, J. & He, X.** (2007): R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 15903-15911.

**Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J. & Moon, R. T.** (2005): The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Curr. Biol.* 15, 489-500.

**Weis, S. M. & Cheresh, D. A.** (2005): Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437, 497-503.

**Welcker, M., Orian, A., Grim, J. A., Eisenman, R. N. & Clurman, B. E.** (2004a): A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr. Biol.* 14, 1852-1857.

**Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J. E., Harper, J. W., Eisenman, R. N. & Clurman, B. E.** (2004b): The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9085-9090.

**Wilfinger W. W., Mackey, K. & Chomczynski, P.** (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474-481.

**Willert, K., Brink, M., Wodarz, A., Varmus, H. & Nusse, R. (1997):** Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J.* 16, 3089-3096.

**Willert, J., Epping, M., Pollak, J. R., Brown, P. O. & Nusse, R. (2002):** A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev. Biol.* 2, 8.

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

**Willert, K. & Jones, K. A. (2006):** Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.* 20, 1394-1404.

**Winston, J. T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C. Y., Elledge, S. J. & Harper, J. W. (1999):** The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 13, 270-283.

**Wood, M. A., McMahon, S. B. & Cole, M. D. (2000):** An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell* 5, 321-330.

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

**Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J. & Larsson, L.-G. (2003):** Myc represses differentiation-induced *p21CIP1* expression via Miz-1-dependent interaction with the *p21* core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.

**Xing, Y., Clements, W. K., Le Trong, I., Stenkamp, R., Kimelman, D. & Xu, W. (2004):** Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function. *Mol. Cell* 15, 523-533.

**Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. & Beach, D.** (1991): Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699.

**Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K. & Nakayama, K. I.** (2004): Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* 23, 2116-2125.

**Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. & Nelson, M.** (2005): Deconstructing the cadherin-catenin-actin Complex. *Cell* 123, 889-901.

**Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S. & Kikuchi, A.** (1999): Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 274, 10681-10684.

**Yanagawa, S., van Leeuwen, F., Wodarz, A., Klingensmith, J. & Nusse, R.** (1995): The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev.* 1995, 1087-1097.

**Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C. M., Nevins, J. R., Means, A. R. & Sears, R.** (2004): A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 308-318.

**Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Iida, K. T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., Tanaka, K. & Yamada, N.** (2003): p57<sup>Kip2</sup> regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 52919-52923.

**Yu, Z. K., Gervais, J. L. & Zhang, H.** (1998): Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21 (CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11324-11329.

**Zeng, Y. & Cullen, B. R.** (2002): RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8, 855-860.

**Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J. & He, X.** (2005): A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877.

**Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J. C. & He, X.** (2008): Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin function. *Development* 135 (2), 367-375.

**Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W. & Dean, D. C.** (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.

**Zhang, X., Gaspard, J. P. & Chung, D. C.** (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 61, 6050-6054.

**Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H. & Levine, A. J.** (2000): Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 14, 981-993.

**Ziegler, S., Röhrs, S., Tickenbrock, L., Möröy, T., Klein-Hitpass, L., Vetter, I. & Müller, O.** (2005): Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation. *FEBS J.* 272, 1600-1615.

**Ziegler, W. H., Liddington, R. C. & Critchley, D. R.** (2006): The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16, 453-460.

**Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. & Roussel, M. F.** (1998): Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424-2433.

**Zou, Y., Ewton, D. Z., Deng, X., Mercer, S. E. & Friedman, E. (2004)** : Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J. Biol. Chem.* 279, 27790-27798.

**Zwijsen, R. M., Wientjens, E., Klompaker, R., van der Sman, J., Bernards, R. & Michalides, R. J. (1997)**: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88, 405-415.