

**Interaktion des β -Catenin- und MAPK-
Signalwegs und ihre Rolle in der
TumortheraPIeresistenz**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kirschnick, Melissa Elfriede

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Braeuning

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.2	Signalwege.....	4
1.2.1	Der Wnt-Signalweg.....	4
1.2.2	Der MAPK-Signalweg.....	7
1.2.3	Interaktion zwischen Wnt- und MAPK-Signalweg.....	9
1.3	Therapie des hepatozellulären Karzinoms.....	11
1.4	Inhibitoren der Signalwege.....	14
1.4.1	Inhibitoren für den Wnt-Signalweg.....	14
1.4.2	Inhibitoren für den MAPK-Signalweg.....	14
1.5	Fragestellung.....	16
2	Materialien und Geräte.....	18
2.1	Geräte.....	18
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.3	Chemikalien.....	20
2.4	Puffer und Lösungen.....	21
2.5	Zelllinien.....	29
2.6	Vektoren.....	31
2.7	Primer.....	33
2.8	Kits.....	33
2.9	Software.....	33
2.10	Internetseiten.....	34
3	Methoden.....	35
3.1	Zellkultur.....	35
3.2	Transfektion.....	39
3.3	Plasmide: Anzucht und Isolierung.....	41
3.4	Reportergen-Untersuchung.....	42
3.5	Untersuchung der mRNA-Expression.....	44
3.6	Zellvitalität und Zytotoxizität.....	49
3.7	Untersuchung der Zellproliferation.....	52
3.8	Tests zur Apoptose.....	53

4	Ergebnisse	56
4.1	Effizienzanalyse und Zytotoxizität der Inhibitoren.....	56
4.2	Interaktionen zwischen dem Wnt- und dem MAPK-Signalweg.....	57
4.2.1	Analyse auf der Ebene der Transkription.....	57
4.2.2	Untersuchung auf mRNA-Ebene.....	59
4.2.3	Bead-basierter Protein-Array	60
4.3	Doppelinhibition des Wnt- und des MAPK-Signalwegs	61
4.3.1	Zytotoxizitätsassays.....	61
4.3.2	Sulforhodamin B-Proliferationsassays	66
4.3.3	Caspase-Aktivität.....	68
4.3.4	Zellbilder und Hoechst-Färbung.....	70
4.4	Sorafenib-resistente Zellen.....	71
4.4.1	Anzucht Sorafenib-resistenter Zellen	71
4.4.2	Zytotoxizitätsassays mit den Sorafenib-resistenten Zellen	73
4.4.3	Proliferationsassay mit den Sorafenib-resistenten Zellen	75
5	Diskussion	77
6	Zusammenfassung.....	88
7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang.....	97
8.1	Tabellen und Diagramme	97
8.2	Eidesstattliche Erklärung	107

Abkürzungsverzeichnis

AB	Alamar Blue
AFC	7-Amino-4-trifluormethylcoumarin
AFP	Alpha Fetoprotein
AMV	avian myeloblastosis virus
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
bCat	β -Catenin
BSA	Rinderserum Albumin
(c)DNA	(kopierte) Desoxyribonukleinsäure
CK	Casein Kinase
CMV	Zytomegalievirus
Ctnnb1	Gen, welches für β -Catenin codiert
DEAE	Diethylaminoethyl
del	Deletion
DEN	Dimethylnitrosamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DVL	Dishevelled
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EGR-1	early growth response protein 1
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Ex	Exon
FGF2	fibroblast growth factor 2
FH	FH535
FKS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2/SOS	growth factor receptor-bound protein 2/son of sevenless
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
heteroz.	heterozygot
HGF	hepatocyte growth factor
iC	iCRT3
JNK	Jun N-terminal kinase
K	Kontrolle
LB	lysogeny broth
LEF	lymphoid enhancer factor

LRP	lipoprotein receptor-related protein
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kaskade
MDR1	multi drug resistance protein 1
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
NRU	Neutralrot
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBS	phosphatgepufferte Saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PPAR	peroxisome-proliferator activated receptor
RNA	Ribonukleinsäure
(RT-)PCR	(Real-time) Polymerase-Kettenreaktion
So	Sorafenib
STF	SuperTopFlash
TCF	T-cell factor
Temp.	Temperatur
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	U0126
VEGF(R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
Vem	Vemurafenib
wt	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Weltweit ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) der fünfthäufigste bösartige Tumor und mit über 500.000 Todesfällen/Jahr die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache. Bei Männern ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit dreimal höher als bei Frauen. In den letzten 30 Jahren hat sich die Inzidenz bei Männern als auch Frauen verdoppelt. Gründe dafür sind vor allem die zunehmende Häufigkeit von Leberzirrhose und die steigende Anzahl an Hepatitis B- und Hepatitis C-Infektionen. Besonders häufig ist das HCC in Südostasien und Afrika [1, 2]. Ein erhöhtes Risiko ein HCC zu entwickeln besteht nicht nur bei Hepatitis-Infektionen, sondern z. B. auch bei chronischem Alkoholkonsum, nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) und Exposition mit dem Schimmelpilzgift Aflatoxin B [3].

Das HCC beruht auf einer sehr komplexen und vielfältigen molekularen Pathogenese, welche noch immer sehr unklar ist [4]. Im Mittelpunkt der HCC-Entstehung stehen zwei grundlegende Mechanismen: 1. Leberzirrhose mit Bildung dysplastischer Knoten nach einem Gewebeschaden durch Inflammation und 2. Entstehung von Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen [5].

Derzeit existieren zwei Hypothesen zur molekularen Pathogenese: Die ältere ist das Mehrstufen-Modell der Karzinogenese. Es umfasst drei Stufen: Initiation, Promotion und Progression. Während der Initiation

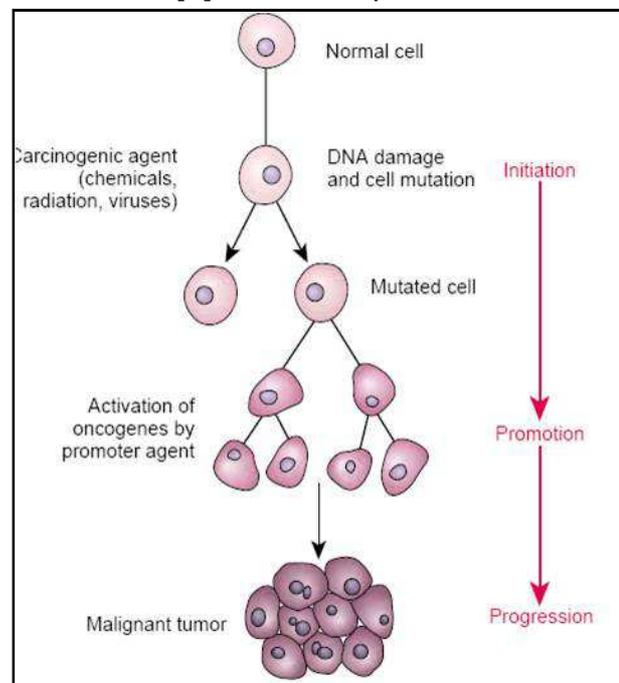


Abbildung 1: Mehrstufen-Modell der Karzinogenese (www.hakeem-sy.com)

entsteht ein spontaner oder durch Karzinogene ausgelöster DNA-Schaden. Betrifft dieser ein Proto-Onkogen oder Tumorsuppressorgen und kann von der Zelle nicht repariert werden, kommt es zur Störung des Zellzyklus und der Regulation des Zelltods. In der Promotionsphase vermehrt sich die Zelle ungehindert und bildet zahlreiche Zellklone - ein präneoplastischer Knoten entsteht. Nach Erwerb weiterer Mutationen entsteht ein benigner Tumor. Zur Progression kommt es, wenn die Zellen weitere Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen und andere genetische Aberrationen erworben haben. Die Zellen teilen sich kontinuierlich und sind entdifferenziert, d. h. sie unterscheiden sich stark vom Normalgewebe und haben die Fähigkeit zur Metastasierung [6, 7].

Die neuere Hypothese ist das sogenannte „Krebs-Stammzell-Modell“. Sie basiert auf der Idee, dass jeder Tumor eine Subpopulation an Krebsstammzellen besitzt. Diese sind unendlich teilungsfähig und können mehrere verschiedene Linien an Krebszellen bilden. Ein Tumor besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die sich phänotypisch unterscheiden und starke oder nur geringe Fähigkeiten zur Vermehrung und Differenzierung besitzen.

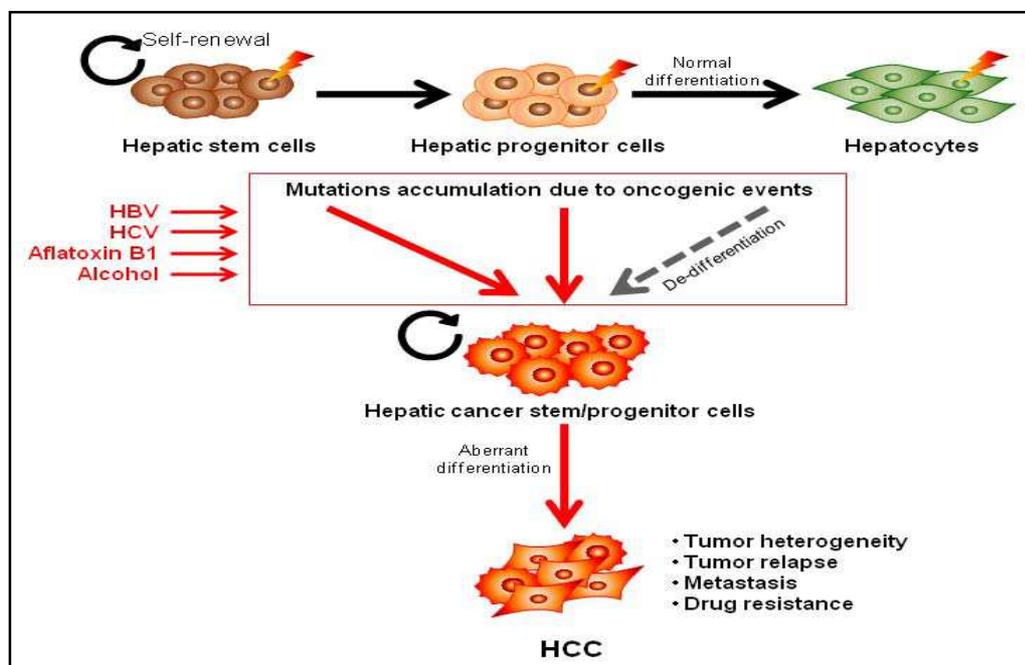


Abbildung 2: Stammzellmodell der HCC-Entstehung. (Kumar, 2011)

Als erstes wurden Krebsstammzellen in der myeloischen Leukämie beschrieben [8], danach in zahlreichen soliden Tumoren wie z. B. dem Mamma-, Kolon- und Leber-Karzinom. In der Leber gibt es Hinweise auf den Ursprung der Krebsstammzellen. Man vermutet, dass hepatische Progenitorzellen aus den Hering-Kanälen bei chronischer Leberschädigung aktiviert werden und sich zu einer Population von Krebsstammzellen entwickeln [4]. Die Theorie einer langsam proliferierenden multipotenten Krebsstammzell-Population bietet Erklärungen für die starke Resistenz des HCC gegen die konventionelle Chemotherapie, welche auf rasch proliferierende Zellen abzielt [9].

Die beiden Modelle widersprechen sich nicht, sondern sind vielmehr komplementär. Hepatozyten oder ihre Progenitorzellen erwerben schrittweise Mutationen und epigenetische Veränderungen, sodass es bei dieser Subpopulation an Hepatozyten zum Verlust der Zellzyklus-Kontrolle und zur genetischen Instabilität kommt. Sie proliferieren und bilden schließlich eine Masse von entdifferenzierten reifen Tumorzellen [10].

Infolge von Mutationen geht die Hepatokarzinogenese immer mit der Veränderung von zellulären Signalwegen einher, welche zu erhöhtem Zellwachstum und -vermehrung führen, siehe Abbildung 3 [5]. In ihrer Aktivität häufig verändert sind das Protein p53, das Retinoblastom-Protein, Janus Kinasen, Epidermal Growth Factor/Transforming Growth Factor β (EGF/TGF- β)-Signalwege, der Wnt-Signalweg und die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Kaskade [3]. Im folgenden Kapitel wird genauer auf den Wnt- und den MAPK-Signalweg eingegangen.

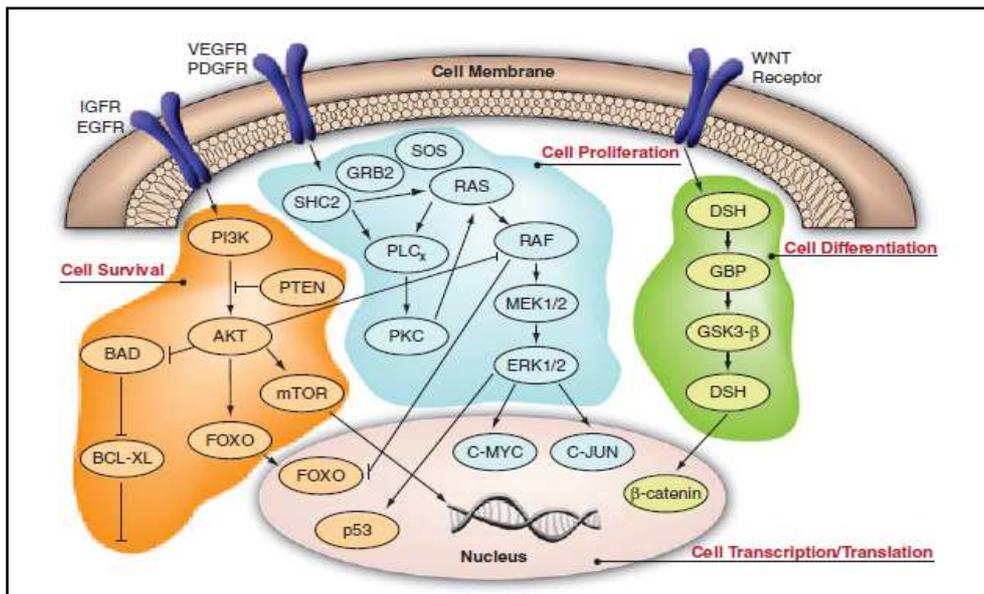


Abbildung 3: An der Hepatokarzinogenese beteiligte zelluläre Signalwege. Komplexe Interaktion vieler Signalmoleküle. Orange: Im Zentrum steht AKT, eine Proteinkinasefamilie, die das Zellüberleben fördert. BAD und BCL-XL sind an der Apoptoseregulation beteiligt. p53 ist ein Tumorsuppressorprotein. Blau: MAPK-Signalweg mit Interaktion zu Protein Kinase C (PKC). C-MYC, ein Protein, welches die Transkription zahlreicher Gene steuert und in vielen Tumoren überexprimiert ist. Grün: Wnt-Signalweg. (Whittaker, 2010)

1.2 Signalwege

1.2.1 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation von Zellen. Der Name „Wnt“ stammt von dem Gen *int-1* ab, welches in *mouse mammary tumor virus* (MMTV)-induziertem Brustkrebs bei Mäusen aktiviert wird [11]. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* heißt das entsprechende Gen *wingless* (*wg*), welches bei Mutation zur Flügellosigkeit führt. Die Kombination beider Namen führte zur Bezeichnung „Wnt“. Wnts sind Glykoproteine, welche von verschiedenen Zellen sezerniert werden. Derzeit sind 19 Wnt-Proteine bekannt [12], von welchen v.a. Wnt 1, 3a und 8 den β -Catenin-Signalweg aktivieren. Diese docken an Frizzled-Rezeptoren und Rezeptoren der low-density lipoprotein receptor-related protein(LRP)-Familie von außen an die Zelloberfläche an. Über das Protein Dishevelled wird das zytosolische β -Catenin stabilisiert und der Signalweg somit aktiviert.

Man unterscheidet den kanonischen und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, welcher sich nochmals in den *planar cell polarity pathway* und den *Wnt/Ca²⁺* Signalweg unterteilt [13]. Im Folgenden wird nur auf den kanonischen Weg eingegangen.

Unter physiologischen Bedingungen liegt der Großteil von β -Catenin über E-Cadherin an die Zellmembran gebunden vor, zytosolisches β -Catenin ist an einen Multiproteinkomplex gebunden. Dieser Komplex aus Axin, Casein Kinase 1 α (CK1 α) und Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) phosphoryliert freie Serin- und Threonin-Reste von β -Catenin, markiert es somit für die Ubiquitinylierung und es kommt zum Abbau von β -Catenin durch das Proteasom.

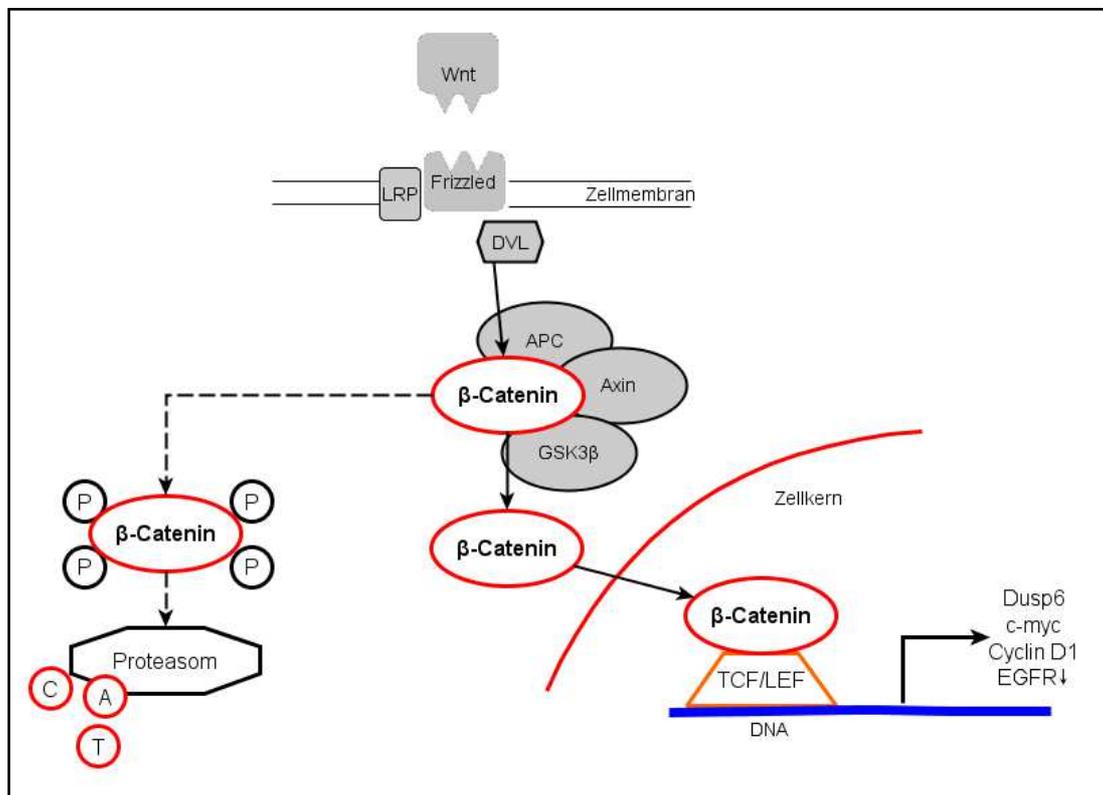


Abbildung 4: Wnt-Signalweg. Unter physiologischen Bedingungen wird β -Catenin durch das Proteasom abgebaut (gestrichelte Linie). Anbindung von Wnts an den Frizzled-Rezeptor und das low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) bewirkt über Dishevelled (DVL) die Freisetzung von β -Catenin. Im Kern bindet es an den T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) und aktiviert die Transkription zahlreicher Gene.

In der Embryonalentwicklung und unter pathophysiologischen Bedingungen wird der Multiproteinkomplex durch Bindung von Wnts und folgender Phosphorylierung der GSK3 β inaktiviert. β -Catenin wird freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo es die Transkription durch Interaktion mit dem T cell factor/lymphoid enhancer factor

(TCF/LEF) und anderen Transkriptionsfaktoren aktiviert [14, 15]. Es kommt zur Transkription von Genen wie *c-MYC*, *MMPs*, *Cyclin D1* und *IFT-2* [16-18], die wichtig sind für Differenzierung und Proliferation.

β -Catenin spielt eine wichtige Rolle in der frühen Karzinom-Entwicklung. Das hepatozelluläre Karzinom des Menschen ist in einem Drittel, das Hepatoblastom, der häufigste Lebertumor im Kindesalter, sogar in 60-80% der Fälle im Gen *CTNNB1* mutiert, welches für den Transkriptionsfaktor von β -Catenin kodiert [19]. Dabei kommt es zur verstärkten Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und somit zur verstärkten Zellproliferation [20]. Das β -Catenin-Gen ist meist im Exon3 durch eine Punktmutation oder Deletion mutiert. Dadurch sind die Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen verändert und der proteasomale Abbau von β -Catenin wird verhindert [21]. Dabei besteht eine Assoziation zu chronischen Virusinfekten, 33% dieser *CTNNB1*-mutierten HCC sind HCV-positiv [22].

Nach der COSMIC Datenbank ist β -Catenin bei 17% der HCC mutiert, hierzu finden sich jedoch in anderen Publikationen leicht abweichende Daten. Erhöhte β -Catenin-Mengen sind in 12-26% der Fälle auf eine Mutation im β -Catenin-Gen zurückzuführen, in 8-13% der Fälle sind andere Gene, welche zur Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs führen, mutiert [5, 23]. *AXIN1* und *AXIN2* sind in 10% der HCC und Hepatoblastome mutiert [24]. Insgesamt erhöhte β -Catenin-Mengen im Zytoplasma und im Zellkern, egal ob mit oder ohne Mutation, finden sich bei 50-70% der HCC [25].

Der β -Catenin-Signalweg spielt also eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Progression von Leberkarzinomen. Eine veränderte Wnt-Signalwegaktivität besteht aber auch in vielen anderen Tumoren. Bei der familiären adenomatösen Polyposis liegt eine Keimbahnmutation im *APC*-Gen vor, bei fast allen betroffenen Patienten entwickelt sich im Laufe des Lebens ein kolorektales Karzinom. Und auch die sporadischen kolorektalen Karzinome sind in 80% *APC*-mutiert [26]. Melanome haben oft erhöhte β -Catenin-Mengen im Zellkern und häufig ist die CK1 α -Expression unterdrückt [27]. Außerdem findet man in Karzinomen des Magens, des Pankreas, des Endometriums und des Ovars β -Catenin-Mutationen [28].

1.2.2 Der MAPK-Signalweg

Sechs verschiedene MAPK-Signalwege sind in Säugerzellen bekannt. Sie alle spielen eine wichtige Rolle in der Genexpression und sind nach einem bestimmten Muster aufgebaut: Infolge der extrazellulären Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Stress wird intrazellulär ein kleines G-Protein rekrutiert, welches eine Phosphorylierungskaskade über drei verschiedene Kinasen auslöst. Der Signalweg wird jeweils nach der letzten Kinase benannt, neben sieben ERKs (extracellular signal-regulated kinases) sind dies die JNK (Jun N-terminal kinase) und p38 [29].

Der wichtigste und in menschlichen Karzinomen am häufigsten fehlregulierte MAPK-Weg ist der ERK1/2-Signalweg, er wird daher auch klassischer oder kanonischer MAPK-Signalweg genannt [30]. Der MAPK-Signalweg/MAPKK (MAPK-Kaskade) steuert die Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und das Überleben von Zellen. In Krebszellen ist seine Aktivität häufig erhöht.

Die Aktivierung der Kaskade geschieht durch Bindung von Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) oder platelet-derived growth factor (PDGF) an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z. B. an den epidermal growth factor receptor (EGFR) [5]. Diese Rezeptortyrosinkinasen rekrutieren den Proteinkomplex growth factor receptor-bound protein 2/son of sevenless (GRB2/SOS) an die innere Zellmembran, wo dieser das kleine G-Protein RAS aktiviert. RAS ist eine GTPase, welche dann vom inaktivem GDP-gebundenen Zustand in den GTP-gebundenen übergeht [31] und so die Kinase RAF aktiviert. Mit Hilfe des Scaffold-Proteins werden die Kinasen RAF, MEK und ERK miteinander in Kontakt gebracht und eine Phosphorylierungs-Kaskade wird ausgelöst [32]. ERK1 und ERK2 translozieren in den Zellkern, wo sie viele Transkriptionsfaktoren aktivieren. Es kommt zur Transkription von Genen wie *c-FOS*, *MYC*, *JUN* und *EGR-1*, die wichtig für Wachstum, Überleben und Differenzierung sind [29, 33].

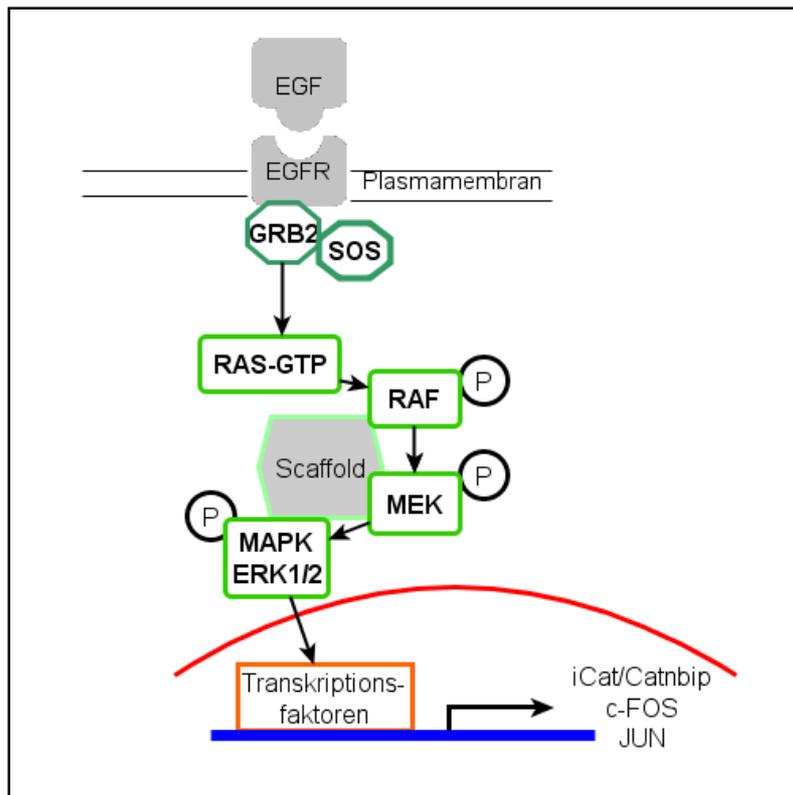


Abbildung 5: MAPKK. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF) an Zellmembranrezeptoren wird RAS aktiviert, welches eine Phosphorylierungskaskade von RAF, MEK und ERK auslöst. Nach Translokation von ERK in den Zellkern kommt es zur Transkription zahlreicher Gene.

Auf allen Ebenen der MAPKK kann es in Tumoren zu Veränderungen kommen. RAS war das erste aktivierte Proto-Onkogen, welches in menschlichen Tumoren entdeckt wurde [34]. Mutationen in den drei RAS-Isoformen H-RAS, N-RAS und K-RAS finden sich nach der COSMIC-Datenbank in einem Drittel aller menschlichen Karzinome. In mutiertem RAS wird die effektive GTP-Hydrolyse verhindert, was zu konstitutiver Aktivität führt. Dem folgt eine erhöhte Zellaktivität, Differenzierung und Krebsentstehung – über den ERK1/2-Signalweg und über Kommunikation und Aktivierung anderer Signalwege wie dem PI3K- oder JNK-Signalweg, s. auch Abb. 3 [30, 35]. RAS-Mutationen finden sich v.a. in Pankreas-Karzinomen (90%), Adenokarzinomen der Lunge (35%) und in der Schilddrüse [36]. Leberkarzinome sind bis zu 30% N-RAS- und zu 6% K-RAS-mutiert [37].

Außerdem findet man häufig aktivierende Mutationen in den RAF-Isoformen. B-RAF ist in 66% der Melanome mutiert, zudem häufig im Kolon, der Schilddrüse und dem Ovar [38]. In der Leber jedoch ist RAF sehr selten mutiert.

Mutationen in Genen des MAPK-Wegs konzentrieren sich v.a. auf *RAS* und *RAF*. Beim HCC ist der MAPK-Signalweg sehr häufig ohne Gen-Mutation konstitutiv aktiv: Hwang et al. [39] beschreiben eine Überexpression von C-RAF in 100% der HCC und oft sind Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren überexprimiert [40]. Die MAPK/ERK-Aktivität korreliert positiv mit der Größe von Lebertumoren [41] und die ERK1/2-Aktivierung wurde mit aggressivem Tumorverhalten assoziiert [42]. Der MAPK-Weg spielt also eine bedeutende Rolle in Tumorzellen der Leber und vieler anderer Organe.

1.2.3 Interaktion zwischen Wnt- und MAPK-Signalweg

Sowohl der β -Catenin- als auch der MAPK-Signalweg spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Sie sind eng miteinander verbunden und in den letzten Jahren wurden immer mehr Verknüpfungen zwischen den beiden Wegen herausgefunden. Für genaue Informationen zu den Interaktionen zwischen dem RAS- und dem Wnt-Signalweg siehe Review „Mechanisms of RAS/beta-catenin interactions; Zeller et al. 2013“ [43].

In vielen Karzinomen wurde eine simultane Aktivität der beiden Signalwege festgestellt, beispielsweise beim kolorektalen Karzinom [44]. Bei in vivo-Experimenten wurde im Darm der Maus [45], in der Leber [46] und in der Haut [47] eine Kooperation der beiden Wege festgestellt. Dagegen weisen andere Forschungsergebnisse auf komplett unabhängige Tumorentstehungsmechanismen durch den β -Catenin-Signalweg und den RAS-Signalweg hin, z. B. im Pankreas [48] und in der Leber. In der Maus bilden sich unter N-Nitrosodiethylamin(DEN)-Behandlung nur *H-ras*-mutierte Lebertumoren (in 30% der Fälle), unter zusätzlicher Phenobarbital-Behandlung bilden sich nur β -Catenin-mutierte Tumoren (in 80% der Fälle) [49]. Jedoch treten nie beide Mutationen gleichzeitig auf. Außerdem unterscheiden sich sowohl die Genexpressions-Profile als auch der Phänotyp der beiden Tumortypen stark [22].

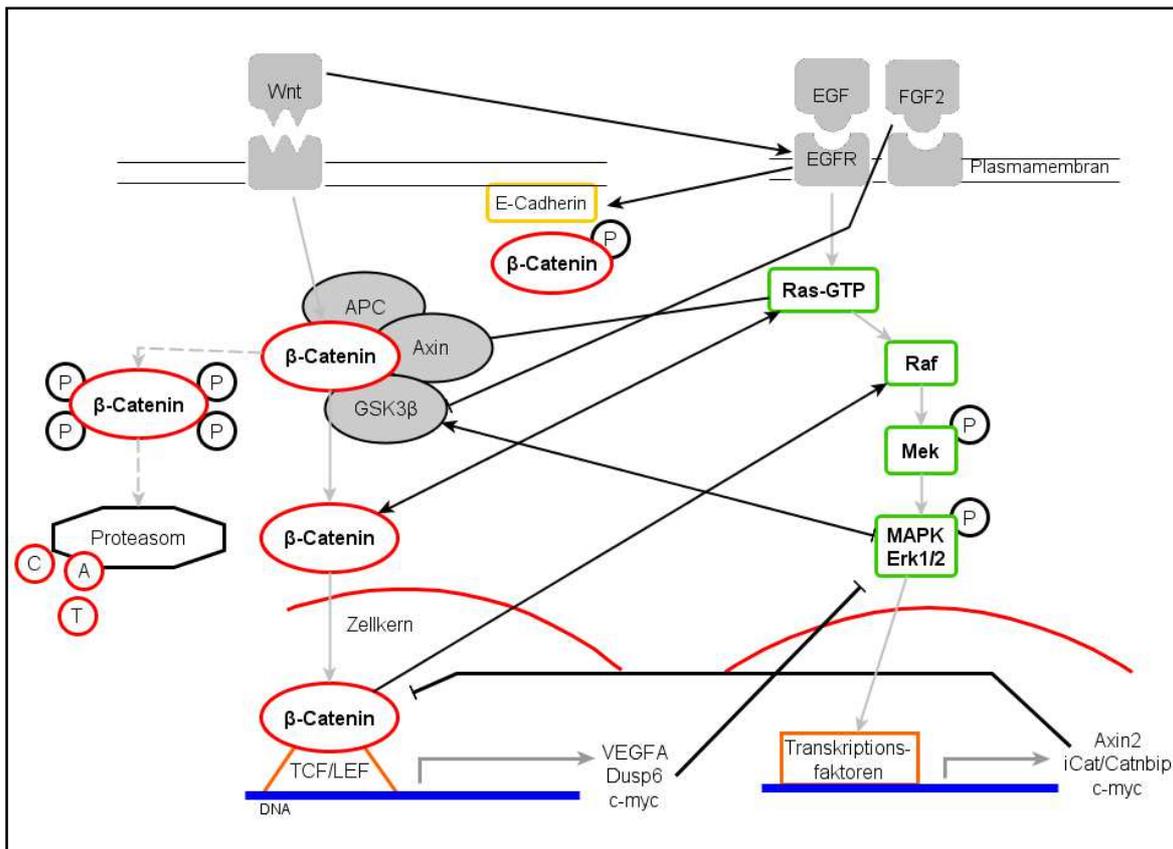


Abbildung 6: Einige Interaktionen zwischen dem Wnt- und dem MAPK-Signalweg. Hemmender Mechanismus (Linie mit Balken --|), induzierender Mechanismus (Linie mit Pfeil →), Beeinflussung unbekannter Art (nur Linie).

Es existieren viele Interaktionen auf der Ebene der Zellmembran: TGF α und VEGFA, deren Transkription abhängig von β -Catenin ist, können den MAPK-Signalweg aktivieren; in Brustkrebszellen und Fibroblasten kann EGFR durch die Wnts aktiviert werden [50-53]. In einem Mausstamm mit Überexpression von Wildtyp- β -Catenin wurde die mRNA des EGFR hochreguliert, in Maushepatom-Zelllinien mit Apc-Knockout oder *Cttnb1*-Mutation wurde EGFR jedoch herunterreguliert [54, 55]. EGF/EGFR-Aktivierung in Krebszelllinien der Mundschleimhaut wiederum induziert Aktivität des β -Catenin-Signalwegs [56]. EGFR ist in der Lage β -Catenin zu phosphorylieren und bewirkt so die Ablösung des membranständigen β -Catenins von E-Cadherin [57]. Das an der RAS-Aktivierung beteiligte Adapterprotein GRB2 beeinflusst auf mehreren Wegen den Wnt-Signalweg [58]. Sowohl APC als auch Axin als Komponenten des Degradierungskomplex von β -Catenin beeinflussen die RAS-Proteinmengen mit [59, 60]. Außerdem wird die RAS-Degradierung von Negativregulatoren des Wnt-Signalwegs gefördert und somit führt β -Catenin-Mutation und Aktivierung zur RAS-Stabilisierung [61].

Auch im Zytosol gibt es zahlreiche Interaktionen: RAS-aktivierende Wachstumsfaktoren wie FGF2 inaktivieren GSK3 β und führen so zur Kerntranslokation von β -Catenin [62]. In Osteoblasten inaktivieren Erk1 und Erk2 GSK3 β durch Phosphorylierung [63]. Und auch in HeLa(Zervixkarzinom)-Zellen und Skelettmuskelzellen wurde eine durch GSK3 β vermittelte Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs durch den RAS-Signalweg festgestellt [64]. Nukleäres β -Catenin bildet einen Komplex mit TCF, welcher über einen noch unbekanntem Mechanismus wieder RAF1aktiviert [53]. Umgekehrt wirkt GSK3 β auch auf den RAS-Weg, z. B. hemmt es in Kolon-Krebszellen ERK1/2 über die Protein Kinase C [65].

Im Kolonadenom ist K-RAS-Aktivierung für die β -Catenin-Kerntranslokation nötig [66]. Zudem besteht ein synergistischer Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren wie dem *hepatocyte growth factor* (HGF) bzw. der Rezeptortyrosinkinase-Aktivität und der Transkriptionsaktivität von β -Catenin [67]. ICAT bzw. das Gen *Cttnbip1* ist Zielgen des RAS-Signalwegs und gleichzeitig ein negativer Regulator von β -Catenin im Zellkern [68].

Auf Transkriptionsebene bestehen weitere Interaktionen: Die Transkription von β -Catenin wird durch den RAS-Signalweg z. B. über eine AP-1-Bindestelle innerhalb des *Cttnb1*-Promotors beeinflusst [69]. In Kolon-CA-Zellen wurde herausgefunden, dass in 417 Promotor-Regionen sowohl TCF- als auch AP-1-Bindestellen vorliegen, sodass die Hälfte aller Erk- oder β -Catenin-Bindestellen auch vom jeweils anderen Signalweg beeinflusst wird. Ein gemeinsames Zielgen ist z. B. *c-MYC* [70]. Außerdem existieren bei beiden Signalwegen einige Zielgene, die einen Effekt auf den anderen Weg ausüben: z. B. *Dusp6*, welches infolge β -Catenin-TCF-Bindung transkribiert wird, hemmt den RAS-Signalweg [55]. *Axin2*, das unter aktivem Erk über einen *downstream* Effektor transkribiert wird, hemmt direkt β -Catenin [71].

1.3 Therapie des hepatozellulären Karzinoms

Das HCC gehört zu den Tumoren des Menschen, die schwierig therapierbar sind und meistens eine schlechte Prognose haben. Im frühen Stadium ist das HCC asymptomatisch, fast 80% der Karzinome sind bei der Diagnose schon im

fortgeschrittenem Stadium und nicht mehr resektabel. Oft fallen HCC-Patienten durch eine Verschlechterung der zugrundeliegenden chronischen Lebererkrankung auf. Es kommt durch Dekompensation der zuvor meist asymptomatischen Leberzirrhose mit Auftreten von Aszites, Ikterus oder Varizenblutung. Zum Screening eignet sich die Bestimmung des Tumormarkers Alpha-Fetoprotein (AFP) und bildgebende Verfahren wie Ultraschall und CT. Dieses sollte vor allem bei HCV/HBV, Hämochromatose und anderen HCC-risikogefährdeten Patienten regelmäßig durchgeführt werden [72].

Wird das HCC früh diagnostiziert, kann es durch chirurgische Resektion kurativ behandelt werden. Zum klinischen Standard gehören heute auch Chemoembolisation, systemische und intraarterielle Chemotherapie, Lebertransplantation, Radio- und Immuntherapie. Trotz allen Therapieoptionen liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bei nur 7% [5].

Das HCC ist ein relativ chemotherapieresistenter Tumor. Zum einen ist dies möglicherweise auf einen veränderten Metabolismus in Tumorzellen zurückzuführen. Beispielsweise ist bekannt, dass Medikamente-metabolisierende Cytochrom P450-Enzyme in *Cttnb1*-mutierten Lebertumoren der Maus (s. Kapitel 1.2.1) vermehrt exprimiert werden [73]. Zum anderen exprimieren viele Leberkarzinome Membrantransporter wie das Multi Drug Resistance Protein 1 (MDR1), welches Medikamente aus der Zelle befördert [74]. Ein anderer Grund ist die Aktivierung vieler verschiedener Signalwege und ihre Interaktion, welche den Tumorzellen viele Überlebensvorteile verschaffen kann (siehe Abbildung 3).

Herkömmliche Chemotherapien wie Cisplatin mit Gemcitabin haben ein Ansprechen von nur 21% [72], daher rückt die zielgerichtete Krebstherapie (*targeted therapy*) immer mehr in den therapeutischen Mittelpunkt. Dabei werden Zielstrukturen der Zelle, wie bestimmte Rezeptoren oder Proteine, welche für das Tumorwachstum wichtig sind, direkt angegriffen. Da die Angiogenese im HCC eine große Rolle spielt, gibt es schon zahlreiche Therapeutika (Antikörper und sogenannte *small molecule inhibitors*), die VEGF oder VEGFR angreifen, z. B. Bevacizumab und Vatalanib. Auch für den EGFR gibt es mehrere Inhibitoren, die derzeit in der klinischen Testphase sind. Bei vielen Patienten kann die Tumorprogression durch diese Medikamente aufgehalten werden, wirkliche Überlebensvorteile bringen sie jedoch sehr begrenzt [5].

Das einzige Medikament dieser zielgerichteten Therapien, welches beim fortgeschrittenen HCC in Europa und den USA zugelassen ist und deutliche Überlebensvorteile zeigt, ist Sorafenib (Nevaxar®). Eine signifikante Überlebensverlängerung konnte in der Phase III-Studie SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol)-Studie gezeigt werden. Bei fortgeschrittenem HCC zeigten Patienten unter Sorafenib-Therapie (Sorafenib 200mg oral, zweimal täglich) ein mittleres Gesamtüberleben von 10,7 Monaten im Vergleich zu 7,9 Monaten bei Placebo-behandelten Patienten [5].

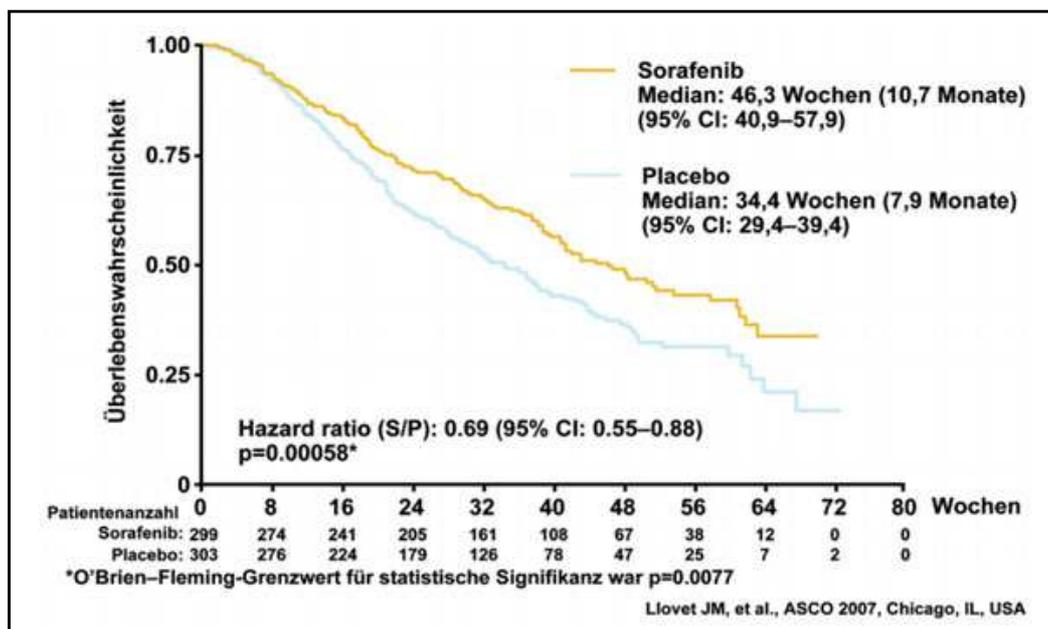


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in der SHARP-Studie. Deutliche Verbesserung des Überlebens durch Sorafenib. (www.hepatitsandmore.de/archiv)

In einer Phase II-Studie konnte mit der Kombinationstherapie Sorafenib und Doxorubicin bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC sogar ein mittleres Überleben von 13,7 Monaten gezeigt werden [75]. Bemerkenswert ist jedoch, dass HCC-Patienten mit Hepatitis B seltener auf Sorafenib anzusprechen scheinen. Eine chinesische Studie mit 90% HBV-Patienten zeigte unter Sorafenib-Therapie das mit 5 Monaten kürzeste mittlere Überleben [76]. Ein weiterer Nachteil des Medikaments ist, dass oft Nebenwirkungen auftreten, die sogar zum Therapieabbruch führen können: häufig sind Hautausschläge, Diarrhö, Haarausfall und Müdigkeit. Die Verlängerung des Überlebens durch Sorafenib beschränkt sich in der Regel auf ca. 3 Monate. Die Lebertumoren entwickeln nach einiger Zeit eine sekundäre Resistenz, welche wahrscheinlich auf die komplexen pathogenetischen Mechanismen, die genetische

Instabilität des HCC und die Interaktion von Signalwegen zurückzuführen ist [77]. Der Wirkmechanismus von Sorafenib wird in Kapitel 1.4.2 beschrieben.

1.4 Inhibitoren der Signalwege

1.4.1 Inhibitoren für den Wnt-Signalweg

iCRT3

Die Bezeichnung des Inhibitors ist eine Abkürzung für „inhibitor of Catenin Responsive Transcription“. Der Inhibitor verhindert durch direkte Bindung an β -Catenin dessen Bindung an TCF4. Er vermindert die Expression der β -Catenin-Zielgene *WISP1*, *Axin2* und *Cyclin D1*. Der iCRT3 hat keinen Einfluss auf die Stabilität und Akkumulation von β -Catenin. In menschlichen Kolon-Biopsie-Kulturen zeigte er sich als stark zytotoxisch [78].

FH535

FH535 ist ein reversibler Inhibitor für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, er bindet direkt an den β -Catenin/TCF-Komplex. Außerdem ist er ein Antagonist für den peroxisomeproliferator activated receptor (PPAR) γ/δ , der eine wichtige Rolle im Fettsäurestoffwechsel spielt und er blockiert die Expression der Zielgene des early growth responsive protein 1 [79, 80].

1.4.2 Inhibitoren für den MAPK-Signalweg

U0126

U0126 ist ein selektiver Inhibitor für MEK1 und MEK2. Er vermindert deren Kinaseaktivität, indem er ihre Aktivierung durch RAF verhindert. Dabei bindet er an MEK1 und MEK2 und nicht an RAF, denn die Phosphorylierung des *myelin basic*

protein durch RAF findet trotzdem statt. Er vermindert die Aktivierung von MEK, schaltet sie jedoch nicht komplett aus [81].

Vemurafenib

Vemurafenib (Zelboraf®) wird seit 2012 klinisch beim malignen Melanom eingesetzt. Eine Phase III-Studie ergab nach sechs Monaten ein Gesamtüberleben von 84% in der Vemurafenib-Gruppe im Vergleich zu 64% in einer Standard-Therapie (Dacarbazine)-Gruppe.

Vemurafenib hemmt spezifisch B-RAF, mit einer 30-fachen Spezifität für die p.V600E mutierte Form im Vergleich zum Wildtyp [82].

Sorafenib

Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher viele Angriffspunkte hat. Als Serin-Threonin-Kinasen-Inhibitor hemmt er durch Blockade der RAF-Kinasen den MAPK-Signalweg [77]. Er drosselt die C-RAF und B-RAF-Aktivität, sowohl im Wildtyp- als auch im mutierten Status. In mehreren Krebs-Zelllinien kam es zur verminderten Phosphorylierung von MEK und ERK [83]. Eisen et al. zeigten, dass die Wirkung von Sorafenib auf das Tumorstadium nicht vom B-RAF-Mutationsstatus abhängig ist [84]. Außerdem hemmt er die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen VEGFR-2 und 3, PDGFR- β und Kit, welche wichtig für die Angiogenese und Tumorstadium sind [83]. Das Medikament induziert Apoptose in mehreren Zelllinien durch Mechanismen, die noch nicht ganz verstanden sind [85]. Es hemmt die Phosphorylierung des eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), welcher in Tumoren Onkogen-Proteine hochreguliert und das anti-apoptotische Protein myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) hinabreguliert [86]. Möglicherweise wird auf diesem Weg die Apoptose ausgelöst [77].

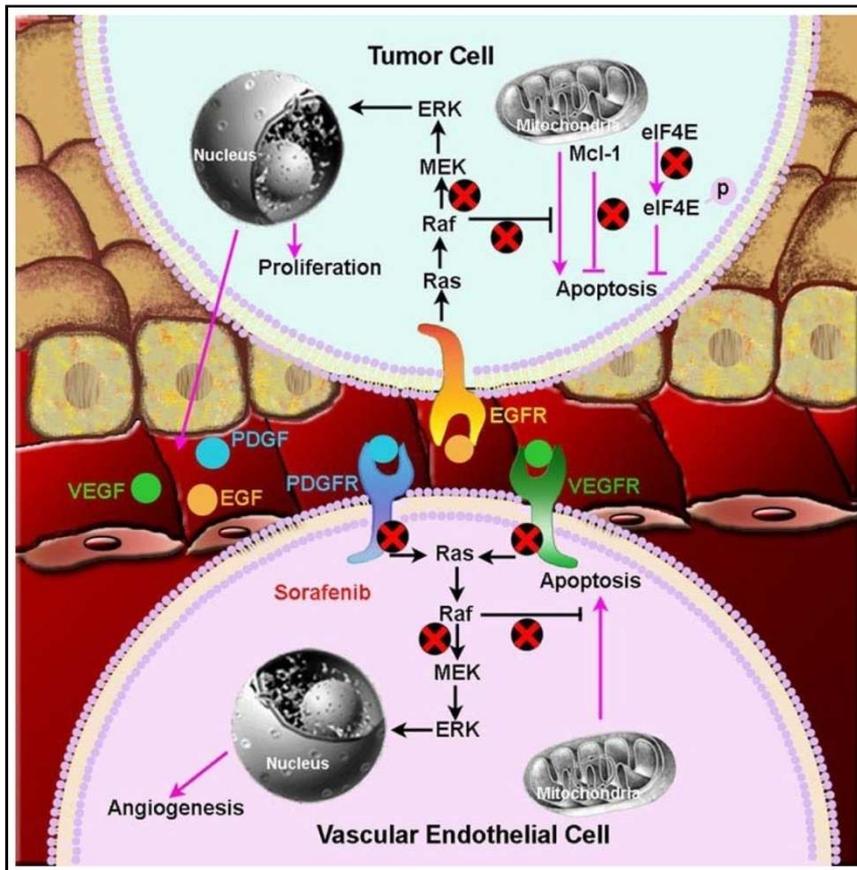


Abbildung 8: Ziele von Sorafenib. Rote Kreuze: Proteine und Aktivierungswege, die durch Sorafenib gehemmt werden. Es hemmt die Angiogenese (über VEGFR und PDGFR) und die MAPKK (RAF) und fördert die Apoptose (über eIF4E und Mcl-1). (Xie, 2012)

1.5 Fragestellung

Die Aktivierung und Überexpression von den Genen des Wnt- und des MAPK-Signalwegs spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung des HCC. Die starke Resistenz des HCC gegenüber zytotoxischen Substanzen macht die Therapie sehr schwierig, nur 30% der Patienten können kurativ behandelt werden [87]. In klinischem Gebrauch ist bereits ein Medikament, welches den MAPK-Signalweg hemmt: Sorafenib hat das mediane Überleben um 2,8 Monate verbessert (s. Abbildung 7). Jedoch sprechen viele Patienten schlecht oder nur eine Zeit lang auf die Therapie an, entwickeln also Resistenzen gegen Sorafenib [77]. Möglich ist, dass die Krebszelle bei der Resistenzentwicklung durch Hochregulation des β -Catenin-

Signalweges erneute Überlebens- und Proliferationsvorteile entwickelt. Noch gibt es kein klinisch einsetzbares Medikament, welches den β -Catenin-Signalweg hemmt.

In der folgenden Arbeit wird zunächst die Interaktion der beiden Signalwege in Leberzelllinien der Maus untersucht: Hierzu stehen uns verschiedene Inhibitoren zur Verfügung (s. Kapitel 1.4). Bei Hemmung des β -Catenin-Signalwegs soll die Aktivität des MAPK-Signalwegs untersucht werden und umgekehrt. Dies soll auf mehreren Ebenen geschehen. Auf Transkriptionsebene lässt sich die Aktivität der beiden Signalwege durch Luciferase-Reportergen-Analysen bestimmen. Die Gesamtmenge an freiem β -Catenin kann mit Proteinisolierung und Bead-Immunoassay ermittelt werden. Außerdem soll auf mRNA-Ebene die Expression von Zielgenen des Wnt- und des MAPK-Signalwegs untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen die beiden Signalwege, mit Hilfe jeweils zweier Inhibitoren, gleichzeitig gehemmt werden. Dabei werden die Zytotoxizität und, über einen längeren Zeitraum, die Wirkung der Simultan-Behandlung auf die Proliferation der Leberzellen untersucht. Bestätigt sich unter den Doppelbehandlungen ein vermehrter Zelltod, soll desweiteren abgeklärt werden, ob die Zellen dabei apoptotisch zugrunde gehen.

Ziel des dritten Teils der Arbeit ist, durch Langzeit-Exposition – entsprechend dem klinischen beobachteten Verhalten der Lebertumore eine Resistenz gegenüber Sorafenib zu entwickeln – Sorafenib-resistente Mausleberzellen in vitro zu züchten. Diese sollen anschließend ebenfalls mit simultaner Inhibition der beiden Signalwege behandelt und der Effekt untersucht werden.

2 MATERIALIEN UND GERÄTE

2.1 Geräte

Tabelle 1: Groß- und Kleingeräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Autoklav C	Webeco
Brutschrank	BB 16 CU	Heraeus
CSC-Kamera	Raytest	CSC Chemolumineszenz Detection Module
Kamera	Digital Camera Coolpix 950	Nikon
Lichtmikroskop	Labovert FS Metallux 3	Leitz Leitz
Luminometer	1420 Multilabel Counter Victor 3 ^v	Perkin Elmer
Magnetrührer	MR 80 IKA-Combimac RCT/IKA Mag RH	Bachofer Janke & Kunkel
Netzgerät	Desatronic 3x500/100 LKB EPS 500/400	Desaga Pharmacia
PCR-Maschine	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meter	F 200 pH-Meter	Beckmann
Pumpe	N711 KN.18	Neuberger
RT-PCR Gerät	LightCycler	Roche
Schüttler	Certomax HK Titramax 1000	Braun Heidolph
Spektrometer	Nanodrop ND-1000	peqlab
Sterilbank	UVF 6.12 S	BDK
Trockenschrank	-	Kendro/Heraeus
Vortexer	Vortex Genie 2 und L	Bender & Hobein AG
Waage	Laborwaage P1200 Analytic	Mettler Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli Q Plus	Millipore
Wasserbad	Typ 1002	GFL
Zählkammer	-	Fuchs-Rosenthal
Zentrifuge	E 5410 E 5317R Mikrorapid K Biofuge 13 Megafuge 1.0R Minifuge RF	Eppendorf Eppendorf Hettich Heraeus Heraeus Heraeus

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäß	-	Greiner, Sarstedt
1,8ml Einfriergefäß	Cryo Tube Vials	Nunc
10cm Gewebekulturschale	Falcon 353003	Becton Dickinson
15ml Polystyren Reaktionsgefäß	Falcon 352095	Becton Dickinson
15ml Reaktionsgefäß	Falcon 352096	Becton Dickinson
2ml Reaktionsgefäß	-	Sarstedt
24-well Gewebekulturplatte	Falcon 353226	Becton Dickinson
50ml Reaktionsgefäß	Falcon 352070	Becton Dickinson
6-well Gewebekulturplatte	Falcon 353224	Becton Dickinson
96-well Gewebekulturplatte	Falcon 353075	Becton Dickinson
96-well Platte weiß	F96 MicroWell Plates	Nunc
Desinfektionsmittelkonzentrat	Helipur	B. Braun
Einmalhandschuhe	Peha-soft nitrile white	Hartmann
Glaspasteurpipetten	Pasteur short size	WU Mainz
Glaswaren		Schott
Kanüle	Microlance 3	Becton Dickinson
LightCycler Kapillaren	LC Kapillaren	Roche
Mehrkanalpipette	Transferpette-12	Brand
Multipipette	Handdispenser Multipipette plus	Eppendorf
Nitrilhandschuhe	Safeskin Purple Nitril	Kimberly-Clark
Parafilm	PM-996	Pechiney
PCR-Reaktionsgefäß (0,2ml)	PCR-tubes 0.2ml	Peqlab
Pipetten und Pipettenspitzen	-	Biozym, Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro	Brand
Spritze	10ml Luer	Becton Dickinson
Sterilfilter	Steritop 0,22µm+ Minisart	Millipore Sartorius
Wattestäbchen	Wattestäbchen 150mm	neoLab
Zellschaber	Costar Cell Lifter	Corning. Inc
Zentrifugenadapter	LightCycler Zentrifuge Adapters	Roche

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ac-DEVD-AFC	Enzo
Ac-LEHD-AFC	Enzo
AFC	Biomol
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma
Ampuwa (steriles Wasser)	Fresenius
ATP	Sigma
BSA	Fermentas
Chloroform	Merck
Coelenterazin	PJK GmbH
Coomassie Brilliant Blue R 250	BIO-RAD
D-Luciferin	PJK GmbH
DMEM F-12	Invitrogen
DMSO	AppliChem
DTT	Sigma
EDTA	Merck
Ethanol	Merck
Etoposid	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	GibcoBRL
FH 535	Calbiochem
G 418 Geneticin-Sulfat	Biochrom
Glyzerin	Sigma
Glyzeringelatine	Merck
HCl	Merck
Hoechst 33258	Sigma
iCRT3	Sigma
Isopropanol	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck
LiCl	Roth
LightCycler FastStart Enzyme	Roche
LightCycler FastStart Reaction Mix	Roche
SYBR Green I	
LightCycler MgCl ₂	Roche
Lipofectamine 2000	Merck
Methanol	Merck
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH-Plätzchen	Merck
Natriumchlorid	VWR Prolabo
Neutralrot	Fluka
NP-40	Fluka

OPTI MEM I	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
<i>Passive Lysis Buffer 5x</i>	Promega
PCR AMV Reverse Transkriptase (10U/ μ l)	Promega
PCR dNTP Mix (10mM)	Promega
PCR MgCl ₂ (25mM)	Roche
PCR Oligo (dT) ₂₀ <i>Primer</i>	Genaxxon
PCR Random <i>Primers</i> (dN) ₆	Roche
PCR Puffer10x	Perkin Elmer
PD 98059	Invivogen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Resazurin	Sigma
Sorafenib	Enzo
Sulforhodamin B Sodium Salt	Sigma
Tricin	Merck
TRizol	Invitrogen
Tris	Sigma
Trockenmedium DMEM/F12	GibcoBRL
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom KG/Seromed
U 0126	Invivogen
Vemurafenib	Selleck

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Kulturmedien und Puffer

Tabelle 4: DMEM/F12-Medium zur Zellkultivierung

Reagenz	Menge
Trockenmedium (GibcoBRL)	6g
NaHCO ₃	1,22g
H ₂ O _{dest}	ad 450ml

- mit HCl_{konz} einen pH=7,2 einstellen
- sterilfiltrieren (Millipore Steritop, Porengröße 0,22 μ m) in 500ml Glasflaschen
- Lagerung bei 4°C

Tabelle 5: Penicillin/Streptomycin-Lösung

Reagenz	Menge
Penicillin	10.000U/ml
Streptomycin	10mg/ml

- bei -20°C lagern

Tabelle 6: Geneticin-Lösung

Reagenz	Menge
Geneticin G418 (Aktivität 740µg/mg)	675,7mg
100mM Hepes pH 7,4	ad 50ml

- sterilfiltrieren
- bei -20°C lagern

Vor Verwendung des DMEM/F12-Mediums folgendes hinzugeben:

Tabelle 7: Zusätze für DMEM/F12-Medium

Reagenz	Menge
FKS (hitzeinaktiviert 30min, 56°C)	50ml für 10% bzw. 5ml für 1%
P/S (10.000U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin)	5ml für 1%
Geneticin (nur Medium der Zellklone)	2,5ml für 0,5%

Mit "DMEM/F12 +/-" beschriftete Flaschen enthalten nur FKS, mit "DMEM/F12 +/+ " beschriftete Mediumflaschen enthalten FKS und P/S. Dem Medium der Zellklone wird zusätzlich Geneticin hinzugefügt.

Tabelle 8: Einfriermedium

Reagenz	Menge
DMEM/F12 +/+	90ml
DMSO	10ml

- Lagerung bei 4°C

Tabelle 9: 10x PBS

Reagenz	Menge	Endkonzentration
NaCl	80g	1,4M
KCl	2g	27mM
KH ₂ PO ₄	2g	15mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	14,35g	80mM
H ₂ O _{dest}	ad 1.000ml	-

- 40min autoklavieren
- für 1x PBS 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnen

1x Trypsin/EDTA

- 10x Trypsin/EDTA 1:10 mit autoklaviertem PBS verdünnen
- Lagerung bei -20°C

Tabelle 10: Kulturmedium und Puffer zur Kultivierung von E.coli

Reagenz	Menge
Bacto <i>Tryptone</i>	10g
Bacto <i>Yeast Extract</i>	5g
NaCl	10g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000ml

- mit NaOH-Plätzchen auf pH 7 einstellen
- 40min autoklavieren
- Lagerung bei RT

Vor Verwendung folgendes Selektionsantibiotikum zugeben:

Tabelle 11: Selektionsantibiotikum für 500ml LB-Medium

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Ampicillin (100mg/ml in H ₂ O _{dest})	0,5ml	100µg/ml

- Lagerung bei -20°C, nach Anbruch bei 4°C
- Antibiotika-Lösung sollte nur einmalig aufgetaut werden

Tabelle 12: LB-Glycerin-Medium für Bakterienstocks

Reagenz	Menge
LB-Medium	5ml
Glycerin (99%ig)	5ml

- sterilfiltrieren
- Lagerung bei -20°C

2.4.2 Zellbehandlung

Tabelle 13: 20mM FH 535-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
FH 535 (MW: 361,2)	10mg	20mM
DMSO	1.385µl	-

- Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

Tabelle 14: 20mM iCRT3-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
iCRT3 (MW: 394,5)	10mg	20mM
DMSO	1.267,4µl	-

- Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

Tabelle 15: 1M LiCl-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
LiCl	424mg	10mM
H ₂ O _{dest}	10ml	-

- sterilfiltrieren
- Lagerung bei 4°C

Tabelle 16: 20mM Sorafenib-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Sorafenib (MW: 464,8)	5mg	20mM
DMSO	537,86µl	-

- Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

Tabelle 17: 20mM U 0126-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
U 0126 (MW: 380,5)	5mg	20mM
DMSO	657,03µl	-

- Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

Tabelle 18: 20mM Vemurafenib-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Vemurafenib (MW: 489,9)	10mg	20mM
DMSO	1.020,6µl	-

- Lagerung als 100µl-Aliquots bei -20°C

2.4.3 Reporteragen-Untersuchung

Tabelle 19: 1000x Coelenterazin

Reagenz	Menge
Coelenterazin	0,605mg
Methanol	1ml

- vor Licht schützen
- Lagerung bei -70°C

Tabelle 20: 1M DTT-Lösung

Reagenz	Menge
DTT	1,545g
H ₂ O _{dest}	10ml

- vor Licht schützen
- Lagerung bei -70°C

Tabelle 21: *Renilla*- und *Gaussia-AP1*-Luciferase-Puffer

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Na ₂ EDTA (200mM)	11ml	2,2mM
Kaliumphosphatpuffer (1M, pH 5,1)	220ml	220mM
BSA	0,44g	0,44mg/ml
NaCl	64,3g	110mM
Natriumazid	0,845g	1,3mM
H ₂ O _{dest}	ad 1.000ml	

- mit KOH pH 5 einstellen
- sterilfiltrieren
- Lagerung bei -70°C
- vor Gebrauch pro 10ml für *Renilla*-Luciferase-Puffer 10µl Coelenterazin zugeben, für *Gaussia-AP1*-Luciferase-Puffer 40µl Coelenterazin zugeben
- vor Licht schützen
- kurzfristige Lagerung (nach erstem Gebrauch) bei -20°C

Tabelle 22: *Firefly*-Luciferase-Puffer

Reagenz	Menge	Endkonzentration
ATP	292mg	530µM
Coenzym A	207mg	270µM
Tricin	3,58g	20mM
MgSO ₄ ·H ₂ O	1,32g	5,34mM
EDTA (200mM)	500µl	0,1mM
H ₂ O _{dest}	ad 1.000ml	-
D-Luciferin	132mg	470µM

- auf pH 8 einstellen
- Lagerung bei -70°C
- vor Gebrauch 333µl 1M DTT pro 10ml *Firefly*-Luciferase-Puffer zugeben
- vor Licht schützen
- kurzfristige Lagerung bei -20°C

2.4.4 Zellvitalitätstests

Tabelle 23: Neutralrot-Lysispuffer

Reagenz	Menge
Essigsäure	1ml
EtOH (100%)	50ml
H ₂ O _{dest}	49ml

Tabelle 24: Alamar Blue Stock-Lösung

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Resazurin	10mg	1mg/ml
H ₂ O _{dest}	10ml	-

- sterilfiltrieren
- Lagerung bei 4°C
- vor Gebrauch 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnen

2.4.5 Sulforhodamin B-Assay

Tabelle 25: Sulforhodamin B-Lösung

Reagenz	Menge
Sulforhodamin B	0,4g
1% HAc	ad 100ml

Tabelle 26: 10mM ungepufferte Tris-Lösung

Reagenz	Menge
Tris-Base	12,12g
HCl _{konz}	pH 7 einstellen
H ₂ O _{dest}	ad 1.000ml

Tabelle 27: 10% Trichloressigsäure

Reagenz	Menge
Trichloressigsäure	10g
H ₂ O _{dest}	ad 100ml

2.4.6 Caspase-Messung

Ac-DEVD-AFC Lösung

Das Ac-DEVD-AFC Substrat wird als 10mM Stocklösung in DMSO gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

AFC Lösung

AFC wird in DMSO in einer Konzentration von 0,1mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert.

BSA Standard

BSA wird in H₂O_{dest} in einer Konzentration von 5mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert.

DTT-Lösung

DTT wird als 1M-Stocklösung in H₂O_{dest} gelöst und bei -20°C gelagert.

Tabelle 28: Protein-Lysispuffer

Reagenz	Konzentration
Tris HCl; pH 8,5	50mM
NaCl	120mM
EDTA	5mM
NP-40	0,5%

- in H₂O_{dest} lösen und bei 4°C lagern
- kurz vor Gebrauch 5µg/ml DTT dazugeben

2.4.7 Hoechst-Färbung

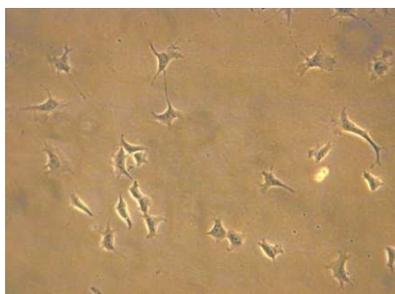
Tabelle 29: Hoechst 33258-Lösung

Reagenz	Menge
Hoechst 33258	500µg
PBS	50ml

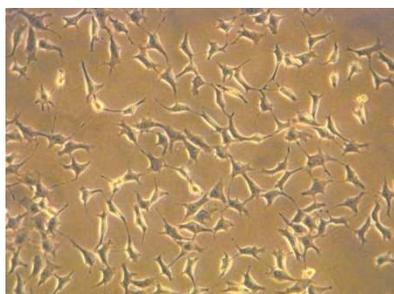
2.5 Zelllinien

70.4

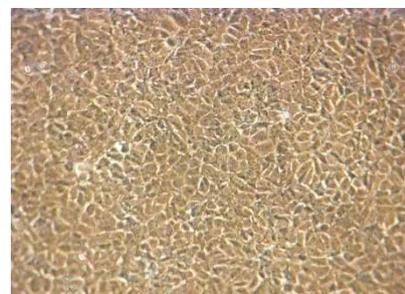
Diese Zelllinie stammt aus dem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus, erhalten von Dr. Kress aus Tübingen. Die Zellen tragen das *Ctnnb1* Wildtyp-Gen. Als Nährmedium wird DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S verwendet.



nach 3 Tagen



nach 5 Tagen



nach 7 Tagen

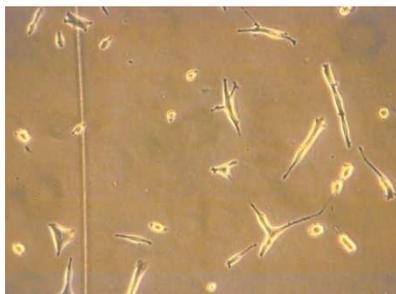
Abbildung 9: Fotos Erhaltungskultur 70.4 im 10er-Objektiv

70.4 K15

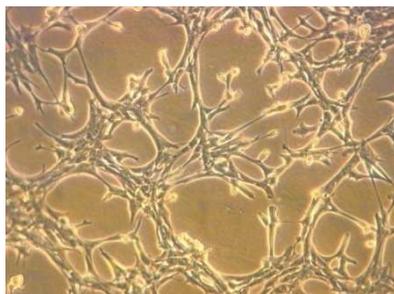
Diese Zelllinie trägt den gleichen Mutationsstatus wie die 70.4-Zellen. Zusätzlich ist sie stabil mit dem dem SuperTopFlash(STF)-Luciferase-Reporter transfiziert. Als Nährmedium wird DMEM/F12 mit 10% FKS, 1% P/S und 0,5% Geneticin (+G-Medium) verwendet.

55.1c

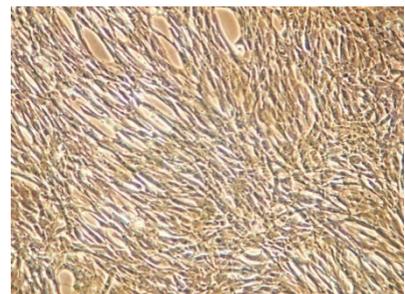
Bei dieser Zelllinie handelt es sich ebenfalls um eine Sublinie aus dem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus. Sie stammt von Dr. Kress aus Tübingen [88]. 55.1c Zellen tragen eine heterozygote Deletion des Exon 3 des *Ctnnb1*-Gens, sodass β -Catenin konstitutiv aktiv ist. Als Nährmedium wird DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S eingesetzt.



nach 3 Tagen



nach 5 Tagen



nach 7 Tagen

Abbildung 10: Fotos Erhaltungskultur 55.1c im 10er-Objektiv

55.1c K53

Auch diese Zellen tragen zusätzlich den STF-Luciferase-Reporter und es wird +G-Medium eingesetzt.

Hepa1c1c7

Diese Maus-Hepatom-Zelllinie stammt von Prof. Poellinger vom Karolinska Institut Stockholm, Schweden. Sie trägt eine heterozygote Deletion des Exon 3 des *Ctnnb1*-

Gens und ist im *h-ras*-Gen homozygot mutiert. Man verwendet ebenfalls das DMEM/F12 Medium, 10% FKS und 1% P/S.

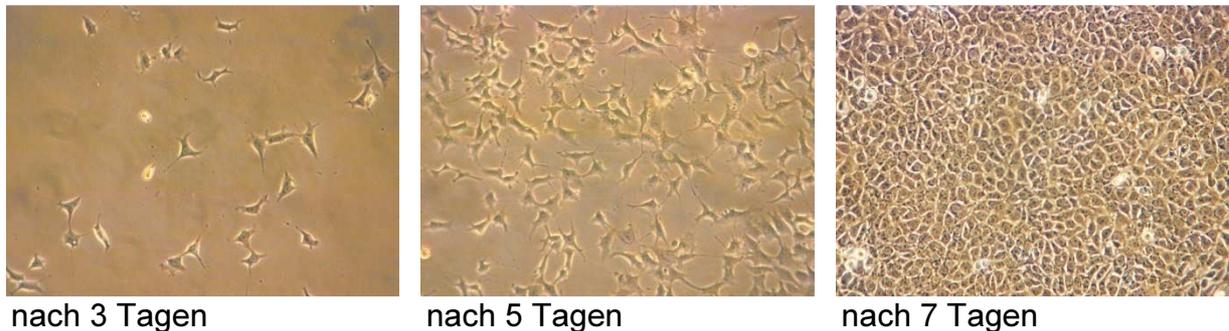


Abbildung 11: Fotos Erhaltungskultur Hepa1c1c7 im 10er-Objektiv

Tabelle 30: Mutationsstatus der Zelllinien

Zelllinie	<i>Ctnnb1</i>	<i>B-raf</i>	<i>H-ras</i>
55.1c	mut (Ex 3 heteroz. del)	mut	wt
55.1c K53 exprimieren STF-Luc- Reporter	mut	mut	wt
70.4	wt	wt	wt
70.4 K15 exprimieren STF-Luc- Reporter	wt	wt	wt
Hepa1c1c7	mut (Ex 3 heteroz. del)	wt	mut

2.6 Vektoren

STF (SuperTopFlash)

Dieses Plasmid trägt 7 TCF/LEF-Bindestellen, welche freies, aktives β -Catenin binden. Den Bindestellen ist das *Firefly*-Luciferase-Gen nachgeschaltet, sodass je nach Aktivierungsgrad mehr oder weniger das Enzym Luciferase transkribiert wird. Der Begriff *Firefly*-, also „Glühwürmchen“-Luciferase entstand durch die Fähigkeit, ein messbares Lichtsignal zu erzeugen. Die Aktivität des Wnt-Signalwegs kann über Messung des Luciferin-Chemolumineszenzsignals detektiert werden. Außerdem enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen. Grundlage ist der pTA-luc-Vektor von Clontech.

pRL-CMV

Dieser Vektor trägt das *Renilla*-Luciferase-Gen, welches durch einen vorgeschalteten CMV-Promotor konstitutiv exprimiert wird. Er wird bei jeder Transfektion in der folgenden Arbeit zur Kontrolle der Transfektionseffizienz cotransfiziert. Auch er besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen. Hier wird der pRL-CMV der Firma Promega verwendet.

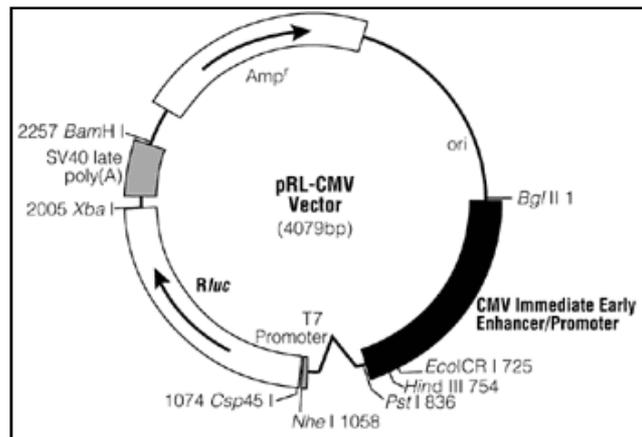


Abbildung 12: pRL-CMV Vektor, Promega (www.promega.de)

Gaussia-AP1

Der Gau-AP1-Vektor stammt von Dr. Ring, Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie, LMU München. Das *Gaussia*-Luciferase-Gen stammt aus einem Ruderfußkrebs. Außerdem trägt der Vektor neben dem Ampicillin-Resistenzgen mehrere AP1-Bindestellen mit sechsfacher TGACTAA-Frequenz und detektiert somit die Aktivität des MAPK-Signalwegs [89].

TSm

Der TSm-Vektor stammt von Dr. Ohrnberger, AG Nordheim, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Tübingen. Er trägt ein *Firefly*-Luciferase-Gen. Vorangeschaltet ist ein cFos-Promotor-Fragment mit einer mutierten AP1-Bindestelle.

2.7 Primer

Tabelle 31: Sequenz der Primer für Real-Time PCR

Primer	Sequenz 5' → 3'	Fragmentlänge [bp]
18s rRNA_F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	187
18s rRNA_R	GCTGGAATTACCGCGGCT	
Axin2_F	CGACGCACTGACCGACGATT	264
Axin2_R	TCCAGACTATGGCGGCTTTCC	
Gpr49_F	AATCGCGGTAGTGGACATTC	156
Gpr49_R	GATTCGGAAGCAAAAATGGA	
mEgr1_F _{neu}	GCCGAGCGAACAACCCTAT	81
mEgr1_R _{neu}	TCCACCATCGCCTTCTCATT	
Fos_F _{neu}	CCGAAGGGAACGGAATAAGA	217
Fos_R _{neu}	CTCTGGGAAGCCAAGGTCAT	

2.8 Kits

Tabelle 32: Kits

Produktname des Kits	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Genopure Plasmid Maxi Kit	Roche
LightCycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I	Roche
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen

2.9 Software

Tabelle 33: Software

Produktname	Hersteller
CSC Kamera Controller 1.11	Raytest
EndNote X6	EndNote
NanoDrop ND-1.000	Coleman Technologies
Office 2007	Microsoft
Origin Pro 6G	Microcal Software
Victor Workout 1.5	Perkin Elmer

2.10 Internetseiten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeines zum Umgang mit der Zellkultur

Die Arbeiten mit der Zellkultur finden nur unter der Sterilbank statt, um Kontaminationen mit Hefen, Bakterien und anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Die verwendeten Gefäße, Pipettenspitzen, Kunststoffwännchen und Lösungen werden vor Gebrauch autoklaviert. Das Grundmedium muss sterilfiltriert werden, da es nicht hitzestabil ist. Die Flaschen und Gefäße werden äußerlich mit 70%igem Ethanol abgespritzt und somit desinfiziert bevor sie unter die Sterilbank gebracht werden. Alle Gefäße werden erst dort geöffnet, anschließend flammt man Flaschenhalse, -deckel und Glaspipetten mit dem Bunsenbrenner ab.

Alle verwendeten Lösungen und Medien werden im Wasserbad auf 37°C erwärmt bevor sie in Kontakt mit den Zellen gebracht werden. Die Zellen wachsen in DMEM/F12-Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellklone 70.4K53 und 55.1cK15 erhalten zusätzlich 0,5% Geneticin ins Medium. Neu angesetztes Medium wird als Aliquot in einer Kulturschale einen Tag im Brutschrank inkubiert, um ein Wachstum von Mikroorganismen auszuschließen.

Die Kultivierung der Zellen findet im Brutschrank bei ca. 95%iger Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO₂ statt.

3.1.2 Mediumwechsel

Im Medium befinden sich für das Überleben und Wachstum der Zellen notwendige Nährstoffe, welche allmählich verbraucht werden. Die entstehenden Stoffwechselprodukte werden von den Zellen in das Medium abgegeben, wodurch sich dessen Farbe von kräftig rot über rosa nach blass orange ändert. Um ein

optimales Wachstum zu ermöglichen, erfolgt der Wechsel des Mediums alle zwei bis drei Tage. Das alte Medium wird mit Hilfe einer Pumpe und einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, das neue wird vorsichtig am Rand aufpipettiert, um eine Beschädigung des Zellrasens zu vermeiden. Auf die zur Erhaltung verwendeten 10cm-Zellschalen werden 10ml Medium gegeben, auf die 6cm-Schalen 4ml.

3.1.3 Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-95% sollten die Zellen passagiert werden, d. h. ein kleiner Teil der Zellen, z. B. ein Tropfen, wird auf eine neue Kulturschale gegeben, sodass die Zellen wieder genug Platz haben um zu wachsen. Bei den 55.1c(K53) und den 70.4(K15) dauert es bei einem Tropfen meist sieben bis neun Tage zur Konfluenz, bei den Hepa1c1c7 ein bis drei Tage länger.

Zunächst wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10ml steriler 1xPBS Lösung gewaschen. Um die adhärenen Zellen von der Platte und voneinander zu lösen, wird 1ml Trypsin auf die Schale gegeben. Nach 3-5min löst sich der Zellrasen von der Schale, was sowohl mikroskopisch, als auch makroskopisch beobachtet werden kann. Ist die Ablösung nahezu vollständig, wird die Reaktion mit 9ml Vollmedium abgestoppt, denn das fetale Kälberserum enthält einen Trypsininhibitor. Die Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze vereinzelt. Nun kann ein Tropfen oder wenige Milliliter direkt auf die Erhaltungsschalen gegeben werden oder die Zellzahl bestimmt werden.

3.1.4 Zellzahlbestimmung mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer

Nach der Trypsinierung kann die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt werden. Dies ist z. B. notwendig, wenn man eine bestimmte Zahl an Zellen pro Kulturschale oder pro *well* aussäen möchte.

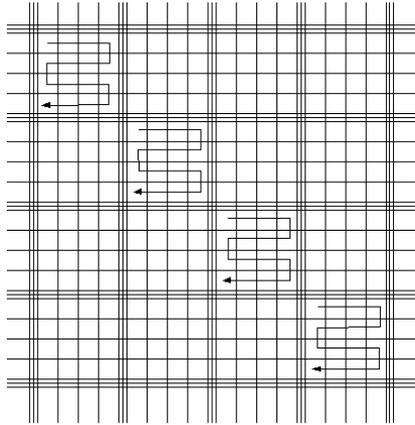


Abbildung 13: Fuchs-Rosenthal-Kammer mit Zählschema (www.aquaculture.ugent.be)

20µl der Zellsuspension werden in einem Eppendorf Cup 1:10 mit 90µl Trypanblau und 90µl 1x PBS verdünnt und kurz mit dem Vortexer gemischt. Ein Deckglas wird durch Anhauchen auf der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer festgesetzt, dabei werden die sogenannten Newton'schen Ringe sichtbar. 15µl der verdünnten Zellsuspension werden auf die Zählkammer pipettiert.

Die Zählkammer besitzt zwei Großquadrate (ein Großquadrat s. Abbildung 13) mit 16 Kleinquadraten, welche wiederum 16 Kleinstquadrate enthalten. Der Flächeninhalt eines Kleinstquadrats beträgt 0,0625mm², die Kammertiefe 0,2mm. Es werden die Zellen vier bis fünf verschiedener Kleinquadrate ausgezählt, dies ist gut in der abgebildeten Zählrichtung durchführbar. Aus dem Mittelwert der Zellen pro Kleinstquadrat lässt sich die Zellzahl z [1/µl] berechnen:

$$\begin{aligned}
 z &= \frac{\text{Zellzahl (Kleinstquadrat)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]}} \\
 &= \frac{\text{Zellzahl (Kleinstquadrat)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0,0625\text{mm}^2 \times 0,2\text{mm}} \\
 &= \emptyset \text{Zellzahl} \times \frac{80}{\mu\text{l}} \times \text{Verdünnungsfaktor}
 \end{aligned}$$

3.1.5 Aussäen der Zellen

Weiß man die Zellzahl der Suspension können die Zellen in beliebiger Dichte für einen Versuch ausgesät werden. Dabei werden die folgenden Zellzahlen verwendet:

Tabelle 34: Zellzahlen auf verschiedenen Kulturplatten

Versuch	Art der Kulturplatte	Zellzahl/well
Zytotoxizitätsassay	96-well	9.000
Behandlung mit anschließender STF-/Gaussia-Messung	24-well	100.000
RNA-Isolierung	6-well	250.000

3.1.6 Einfrieren von Zellen

Das Einfrieremedium und die Kryoröhrchen werden im Eisbad vorgekühlt. Die ca. 90% konfluenten Zellen werden passagiert und die Zellsuspension wird bei 1.000rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 4,5ml Einfrieremedium resuspendiert. Dann werden die Zellen mit je 1,5ml in die Kryoröhrchen aliquotiert und schrittweise gekühlt: Sie stehen mindestens 1h auf Eis, bevor sie dann über Nacht im Eisbad im -70°C-Schrank gelagert werden. Am nächsten Tag können sie dann in den Stickstofftank eingelagert werden.

3.1.7 Auftauen von Zellen

Mit jeder Trypsinierung gelangen die Zellen in eine neue Passage. Haben Zellen schon eine hohe Passage erreicht, ist es möglich, dass sich die DNA und das Verhalten der Zellen verändern. Daher werden bei den meisten Zelllinien in der 80. bis 90. Passage neue Zellen aufgetaut.

Diese werden über Jahre hinweg in Stickstoff-Tanks bei ca. -190°C gelagert. Die Zellen werden allmählich auf Eis und zuletzt bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 40ml Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Die schnelle Verdünnung verhindert einen zytotoxischen Effekt des DMSO, das 10%ig im Einfrieremedium enthalten ist. Nachdem mit 1.000rpm 5min zentrifugiert wurde, wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10ml warmem Medium resuspendiert. Diese Suspension wird auf eine 10cm-Gewebekulturschale gegeben und durch vorsichtiges Schwenken wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet. Nun werden die neuen Zellen im Brutschrank kultiviert und nach der 2. bis 3. Passage können sie wieder für Versuche eingesetzt werden.

3.1.8 Zellbehandlung

Die Zellbehandlung erfolgt in den einzelnen *wells* mit dem jeweiligen Inhibitor oder Aktivator. Dieser wird jeweils auf eine bestimmte Konzentration mit Vollmedium verdünnt (10%FKS, 1% P/S).

3.2 Transfektion

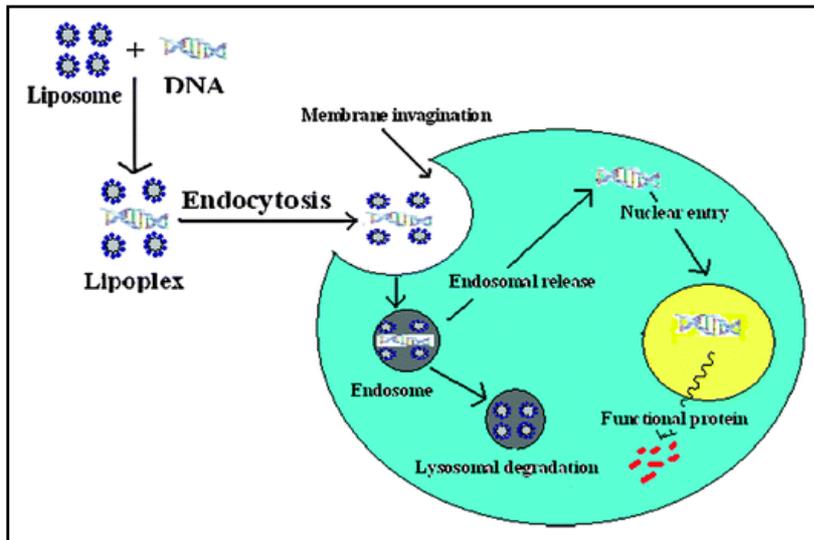
3.2.1 Allgemeines

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet zwischen der stabilen und der transienten Transfektion. Bei der stabilen Transfektion werden die Nukleinsäuren dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut, ein Beispiel sind die STF-transfizierten Zellklone 70.4 K15 und 55.1c K53. Bei der transienten Transfektion werden sie nur kurzzeitig in die Zelle eingebracht.

Dabei gibt es verschiedene Transfektionsmethoden. Chemische sind z. B. die Lipofektion, die DEAE-Dextran-Methode und die Calcium-Phosphat-Präzipitation, physikalisch sind die Elektroporation und Mikroinjektion. Im Folgenden wird die Lipofektion angewendet und beschrieben.

3.2.2 Transiente Transfektion durch Lipofektion

Zur Transfektion der Plasmide wird Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet, ein kationisches Lipidgemisch mit relativ hoher Transfektionseffizienz. Dieses wird mit den STF-, *Gaussia*-AP1- oder *Renilla*-Reporter gen enthaltenden Plasmiden



zusammengebracht.

Dabei bilden sich kationische liposomale DNA-Komplexe, welche mit den negativ geladenen Sialinsäuren der Zellmembran in Wechselwirkung treten. Dies erlaubt der DNA ins Zytosol zu gelangen.

Abbildung 14: Schema des Gentransfers durch Lipofektion

(www.rsc.org)

Die Zellen werden am Vortag auf 24-*well* Platten ausgesät, sodass sie ca. zu 50% konfluent sind. Bei der Transfektion mit Lipofectamine 2000 werden pro *well* 0,8µg Plasmid-DNA (750ng STF- oder *Gaussia*-Plasmid und 50ng pRL-CMV-Plasmid) und 1,6µg Lipofectamine verwendet (Verhältnis 1:2). Es werden Polystyren-Röhrchen verwendet, da Lipofectamin an Polypropylen adsorbiert und die Komplexbildung verhindert. Die Plasmid-DNA und das Lipofectamine wird in OPTI MEM I zunächst separat verdünnt, 5min inkubiert und anschließend zusammengeführt. Nun bilden sich bei 20-minütiger Inkubation die DNA-Lipid-Komplexe. Schließlich werden pro *well* 100µl des Lipofektionsgemisches vorsichtig aufgetropft, da Lipofectamine in hohen Konzentrationen zytotoxisch ist. Nach 4 bis 6h kann, um die Zellen zu schonen, ein Mediumwechsel erfolgen. 24h nach der Transfektion werden die Zellen behandelt.

3.3 Plasmide: Anzucht und Isolierung

3.3.1 Lagerung: Glycerolstocks

Zur Vervielfältigung von Plasmiden werden kompetente *E. coli* verwendet. Bei der sogenannten Transformation wird das zirkuläre, doppelsträngige DNA-Molekül durch einen Hitzeschock in die Bakterien eingebracht. Die transformierten *E.coli* können als Glycerolstock, ein 1:1-Gemisch aus Bakterienkultur in LB-Medium und Glycerin, bei -70°C langfristig gelagert werden.

3.3.2 Anzucht

In einem 2l-Schikanekolben werden 200ml LB-Medium und 200µl Ampicillin-Lösung (100mg/ml) vorgelegt und angeimpft, d. h. mit einer Pipettenspitze werden dem Medium einige Bakterien aus dem Glycerolstock zugesetzt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wird der Ansatz über Nacht bei 37°C im Kolbenschüttler mit 200rpm inkubiert.

3.3.3 Isolierung

Die folgende Plasmid-Präparation erfolgt mit dem Genopure Plasmid Maxi Kit von Roche (Maxipräp). Nach einer Wachstumszeit von höchstens 16h wird die Bakteriensuspension in ein 50ml-Reaktionsröhrchen überführt und 10min abzentrifugiert (4.500rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 3ml Suspensionspuffer, welcher RNase A enthält, resuspendiert. Dann werden 3ml Lysispuffer hinzugegeben, mehrmals invertiert und 5min inkubiert. Die SDS-NaOH-haltige Lösung bewirkt eine Öffnung der Zellwand und der Membran und somit eine Zellyse mit Freisetzung und Denaturierung aller Proteine, der RNA und DNA. Durch Zugabe von 3ml Neutralisationspuffer wird die kleine Plasmid-DNA sofort renaturiert und gelöst, die größere chromosomale DNA und Proteine fallen

aus. Die Suspension wird nach Anfeuchten des Filterpapiers mit Äquilibriumspuffer gefiltert. Dann wird das Filtrat, welches die RNA enthält, auf eine Säule gegeben, welche zuvor auch mit dem Äquilibriumspuffer angefeuchtet wurde. Es folgt ein Waschschrift mit 32ml Waschpuffer. In 15ml warmem Elutionspuffer lösen sich die Nucleinsäuren, werden so aus der Säule entfernt und in einem neuen Falcon aufgefangen. Die noch vorhandene Plasmid-DNA und die RNA werden in Isopropanol gelöst. Nach einstündiger Zentrifugation wird der Überstand verworfen und ein weiterer Reinigungsschrift mit 70%igem Ethanol folgt. Zuletzt wird das Pellet in 250µl Ampuwa Wasser gelöst. Am nächsten Tag wird am Nano-Drop die DNA-Konzentration und deren Reinheit bestimmt (s. Kapitel 3.5.2).

3.4 Reporteragen-Untersuchung

3.4.1 Allgemeines

Reporteragensysteme werden zur Untersuchung eukaryotischer Genexpression verwendet. Sie werden auf Plasmiden durch Transfektion in Zellen eingebracht. Beliebte Reporteragen sind die Luciferasen. Das Luciferase-Gen wird dabei hinter den zu untersuchenden Promotor kloniert. Bindet ein durch Zellbehandlung aktivierter Transkriptionsfaktor wie z. B. β -Catenin an den Promotor, erfolgt die Transkription der Luciferase. Luciferase ist ein Enzym, welches bei Zugabe seines Substrats in der Lage ist, ein Chemolumineszenzsignal zu erzeugen. Dieses kann im Luminometer gemessen werden. Die Lichtintensität entspricht dabei der Stärke der Aktivität des zu untersuchenden Promotors und seines Transkriptionsfaktors.

3.4.2 Firefly-Luciferase Reporterassay

Die *Firefly*-Luciferase katalysiert in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin. Dieses erzeugt ein Chemolumineszenz-Signal, das bei 560nm gemessen werden kann. Mit Mg^{2+} , ATP und Sauerstoff

wandelt die Luciferase das hinzugegebene Substrat Luciferin in Oxyluciferin um, welches lumineszent ist. In den folgenden Versuchen wird der 7xTCF/ β -Catenin-gesteuerte SuperTopFlash *Firefly*-Luciferase Reporter verwendet, um die Aktivität von β -Catenin zu untersuchen.

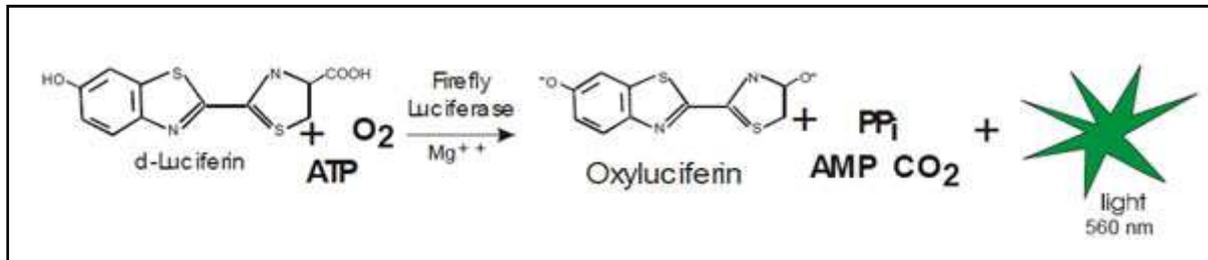


Abbildung 15: Reaktionsschema der *Firefly*-Luciferase (www.biotek.com)

Da die Stärke der Lumineszenz abhängig von der Transfektionseffizienz ist, benötigt man einen Bezugswert. Der pRL-CMV(*Renilla*)-Vektor dient als Coreporter. Er enthält einen CMV-Promotor, welcher konstitutiv aktiv ist, sodass die *Renilla*-Luciferase in allen transfizierten Zellen exprimiert wird. Die *Renilla*-Luciferase setzt Coelenterazin in Coelenteramid um, welches bei 480nm im Luminometer gemessen werden kann.

3.4.3 *Gussia*-Luciferase Reporterassay

Die *Gussia*-Luciferase katalysiert wie auch die *Renilla*-Luciferase ATP-unabhängig in Anwesenheit von Sauerstoff die Umwandlung von Coelenterazin in Coelenteramid. Im Folgenden wird ein Plasmid mit *Gussia*-Luciferase zur Transfektion verwendet, um die Aktivität der MAPK zu überprüfen. Bezugsgröße ist wieder die *Renilla*-Luciferase. Sowohl das *Firefly*- als auch *Gussia*-Signal können auch auf die Anzahl vitaler Zellen, ermittelt mit Alamar Blue (s. Kapitel 3.6.2), bezogen werden.

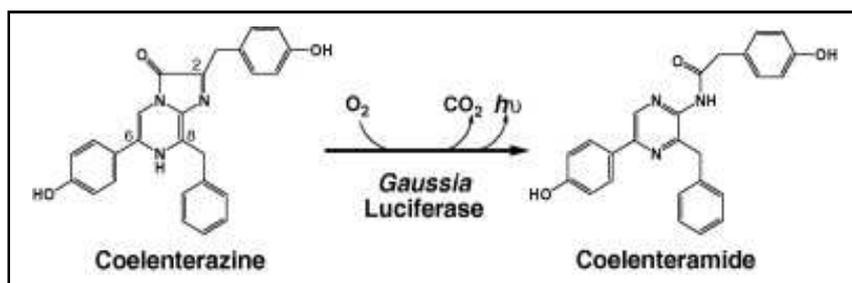


Abbildung 16: Reaktionsschema der *Gussia*-Luciferase (www.sciencedirect.com)

Ablauf

48h nach der Transfektion mit den jeweiligen Vektoren (*Firefly*-Luciferase und *Renilla* für die β -Catenin-Aktivität oder *Gaussia*-Luciferase und *Renilla* für die MAPK-Aktivität), das sind 24h nach der Behandlung, direkt nach der Alamar Blue Messung erfolgt der Reportergen-Assay. Für die *Gaussia*-Messung wird direkt der Überstand der Zellen 75 μ l/*well* auf eine weiße, lichtgeschützte 96-*well* Platte pipettiert und im Platten-Reader gemessen. Für die *Firefly* und *Renilla* werden die Zellen zwei Mal mit 1xPBS gewaschen. Durch Zugabe 100 μ l 1xPassive-Lysis-Buffer erfolgt auf dem Plattenschüttler bei 20-minütiger Inkubation die alkalische Lyse der Zellen. 10 μ l/*well* des Lysats werden auf einer 96-*well* Platte gemessen.

3.5 Untersuchung der mRNA-Expression

3.5.1 RNA-Isolierung

Um die Genexpression der Zellen zu untersuchen, muss die RNA der Zellen isoliert werden. Die Aussaat und Behandlung erfolgt auf 6-*well* Platten. Die Isolierung findet durchgehend auf Eis statt. Um Kontakt mit ubiquitär vorkommenden, stabilen RNAsen zu vermeiden, wird mit Filterpipettenspitzen und mit Handschuhen gearbeitet.

Zunächst wird das Medium von den Zellen abgesaugt und zwei Mal mit 1xPBS gewaschen. Pro *well* werden 500 μ l Trizol aufpipettiert. Dies ist eine Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Lösung, die Zellmembranen zerstört und unter Inaktivierung der RNAsen Nucleinsäuren und Proteine löst. Mit einem Zellschaber werden die Zellen vollständig von der Platte gelöst und in ein 1,5ml Eppendorf Cup überführt. So können sie mehrere Tage bei -20°C gelagert werden.

Im nächsten Schritt werden zu der Zellsuspension 100 μ l Chloroform pipettiert und mindestens 1min lang sehr kräftig geschüttelt. Anschließend wird 15min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert, um die Phasen wieder zu trennen. Es entstehen drei Phasen: Eine untere rote mit Chloroform und Phenol, eine Interphase mit weißen

Schlieren aus DNA und Proteinen und eine obere wässrige Phase mit RNA. Diese wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wird mit 1ml Isopropanol 1h lang bei -20°C die RNA gefällt. Um ein RNA-Pellet zu erhalten, muss nochmal 30min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1ml -20°C kaltem 75%igem Ethanol gewaschen und so von Salzen und Isopropanol befreit. Nach der Zentrifugation (4°C, 15min, 14.000rpm) wird der Überstand wieder verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und gegebenenfalls mit einem Wattestäbchen restliche Wassertropfen entfernt. Durch Zugabe von 20µl H₂O_{dest} wird die RNA über Nacht bei 4°C gelöst.

3.5.2 RNA- und DNA-Quantifizierung

Die Konzentration einer RNA- oder DNA-Lösung wird photometrisch bestimmt. Man misst am NanoDrop-Photometer die Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$. Bei 260nm absorbieren die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren, bei 280nm alle aromatischen Aminosäuren der Proteine. Der Quotient $\frac{\lambda(260\text{nm})}{\lambda(280\text{nm})}$ ist daher ein Maß für die Reinheit einer Probe, er liegt im Idealfall bei 2,0. Liegt der Wert unter 1,7 ist eine Verunreinigung z. B. durch Proteine anzunehmen. 2µl reichen aus, um die RNA einer Probe zu quantifizieren.

Die Konzentration k [µg/ml] wird nach folgender Formel berechnet:

$$k = \text{Extinktion}(260\text{nm}) \times EF \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

EF = empirischer Faktor: RNA=40, DNA=50

3.5.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase lässt sich RNA in cDNA umschreiben, es wird daher auch RNA-abhängige DNA-Polymerase genannt. Das hier verwendete Enzym stammt aus dem *avian myeloblastosis virus*. Um cDNA zu synthetisieren benötigt man Primer. Hier wird ein Oligo-dT-Primer mit ca. 20 Basenpaaren, welcher

an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und *random* Hexamere mit sechs zufälligen Basen verwendet.

Ablauf

Zunächst wird die am NanoDrop quantifizierte RNA auf eine Konzentration von 125ng/μl mit H₂O_{dest} verdünnt. Dann wird folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tabelle 35: Reaktionsansatz RT

Reagenz	Menge
H ₂ O _{dest}	4,85μl
MgCl ₂ (25mM)	3μl
10x Puffer	1,5μl
dNTPs (10mM)	1,5μl
Oligo dT ₂₀ <i>Primer</i> (100μM)	0,38μl
Random dN ₆ <i>Primer</i> (500ng/μl)	0,38μl
AMV-Reverse Transkriptase (10U/μl)	0,39μl
RNA (125ng/μl)	3μl

Maximal 24 Proben können in der Perkin Elmer-PCR-Maschine gleichzeitig transkribiert werden. Die Vervielfältigung findet bei 42°C statt und dauert 1h, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 95°C. Für die nachfolgende RT-PCR werden die cDNA-Proben 1:2 mit H₂O_{dest} verdünnt.

3.5.4 Lightcycler *Real-Time* PCR

Mittels PCR kann durch Vervielfältigung die relative Menge einer bestimmten cDNA ermittelt werden und so die Expression eines Zielgens untersucht werden. Bei der *Real-Time* PCR lässt sich zusätzlich der Verlauf der Amplifikation fluorometrisch verfolgen. Zur Quantifizierung wird der Farbstoff SYBR Green I verwendet, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenz nimmt also proportional zur DNA-Menge zu, welche unter optimalen Bedingungen pro Zyklus verdoppelt wird.

Aus jeder Probe werden mehrere Zielgene bestimmt, wobei als Bezug immer auch ein Referenzgen untersucht wird. In diesem Falle ist dieses die cDNA der konstitutiv exprimierten 18S rRNA. Für jedes Zielgen müssen bestimmte *Primer* verwendet werden, welche genau festlegen, welcher DNA-Abschnitt amplifiziert wird.

Es gilt folgendes Pipettierschema:

Tabelle 36: Pipettierschema LightCycler

Reagenz	Menge
H ₂ O _{dest}	6,5µl
Primer fwd (20µM)	0,25µl
Primer rev (20µM)	0,25µl
10x PCR-Enzym-Mix	1µl
cDNA	2µl

Als Kontrolle wird ein Ansatz mit H₂O_{dest} anstatt cDNA pipettiert. Die Ansätze werden in die dem LightCycler zugehörigen Glaskapillaren pipettiert und kurz zentrifugiert, bevor die Reaktion gestartet wird. Jedes Zielgen wird mit einem bestimmten Temperaturprogramm amplifiziert.

Tabelle 37: Temperaturprogramme

	18S rRNA			Axin2			GPR49		
	Temp.	Dauer	ZA	Temp.	Dauer	ZA	Temp.	Dauer	ZA
Aktivierung	95°C	10min	1	95°C	10min	1	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	5s	35	95°C	8s	50	95°C	5s	55
Anlagerung	68 und 58°C	5 und 10s		62°C	8s		60°C	5s	
Elongation	72°C	8s		72°C	8s		72°C	8s	
Schmelzkurve	65>95°C	0,1°C/s		65>95°C	0,1°C/s		65>95°C	0,1°C/s	

	EGR1			Fos		
	Temp.	Dauer	ZA	Temp.	Dauer	ZA
Aktivierung	95°C	10min	1	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	7s	50	95°C	7s	50
Anlagerung	62°C	7s		59°C	7s	
Elongation	72°C	13s		72°C	4s	
Schmelzkurve	65>95°C	0,1°C/s		65>95°C	0,1°C/s	

ZA=Zyklusanzahl

Im Idealfall erhält man für alle Proben (bis auf die Kontrolle) sigmoidal verlaufende Fluoreszenz-Kurven, wobei die Anzahl der Zyklen auf der x-Achse steht und die Fluoreszenz auf der y-Achse. Eine sigmoidale Kurve entsteht, da zu Beginn der PCR die *Template*-Menge begrenzt und somit das Zusammentreffen von *Primern*, Enzym und DNA weniger wahrscheinlich ist. Gegen Ende sind die Substrate verbraucht und es kommt zur Hybridisierung von Produktfragmenten.

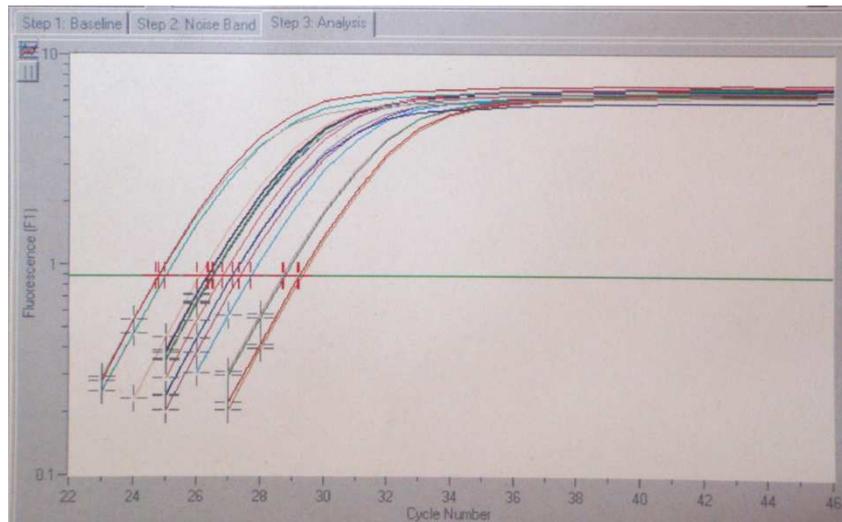


Abbildung 17: sigmoide Amplifikationskurve

Nun werden die sogenannten *crossing points* (CP) bestimmt, die Wendepunkte der Kurven. Hier nimmt die Fluoreszenz am gleichmäßigsten zu und die Kurve verläuft nahezu linear. Je größer die ursprüngliche cDNA-Konzentration ist, desto früher erscheint der *crossing point*. Die relative Expression des Zielgens, d. h. der Faktor (F), um welchen es gegenüber dem Referenzgen exprimiert wird, lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$F = \frac{\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}}^{\Delta CP(\text{Kontrolle-Probe})}}{\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}}^{\Delta CP(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

Die ideale Effizienz der PCR ist in unserem Falle 2. Zur Ermittlung lässt man eine Verdünnungsreihe einer Probe amplifizieren und erhält eine Regressionsgerade, deren Steigung im Regelfall zwischen 1,8 und 2 liegt.

Die PCR endet stets mit einer Schmelzpunktanalyse. Dabei wird die DNA durch kontinuierlich ansteigende Temperatur bis auf 95°C aufgeschmolzen. Die Fragmente spalten sich an einem für sie spezifischen Temperaturpunkt von Doppelsträngen in Einzelstränge auf. Durch Freiwerden des Farbstoffes resultiert ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenz. Nebenprodukte liefern abweichende Temperaturpunkte, die Schmelzkurve ist somit ein Maß für die Reinheit der PCR.

3.6 Zellvitalität und Zytotoxizität

3.6.1 Allgemeines

Der beste Indikator für die Zellvitalität ist die metabolische Aktivität der Zellen. Verschiedene Verbindungen werden von intakten Zellen in fluoreszierende Farbstoffe umgewandelt. Eine geringe Umsetzung ist als Zellschädigung bzw. als geringere Anzahl lebender Zellen zu interpretieren. Gängig sind der Alamar Blue und der Neutralrot-Test. Um bei der Luciferase- und der Gaussia-Messung die Ergebnisse verschiedener *wells* vergleichen zu können, werden die Messwerte immer auf die Zellvitalität mittels Alamar Blue bezogen.

Der Alamar Blue und der Neutralrot-Test werden auch zur Messung der Zytotoxizität von Substanzen verwendet. Dabei werden jeweils in 24-stündigem Abstand die Zellen auf 96-*well*-Platten ausgesät, dann mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt und schließlich deren Vitalität gemessen.

3.6.2 Alamar Blue

Der Alamar Blue Assay ist ein einfacher Test zur Überprüfung der Zellvitalität. Man verwendet eine blaue, ungiftige Resazurinlösung. In lebenden Zellen wird Resazurin von den Mitochondrien in Resorufin, einen fluoreszierenden, pinken Farbstoff reduziert.

Auf 500µl Medium werden 5µl Alamar Blue-Lösung (1mg/ml) pipettiert bzw. auf 100µl Medium 1µl (96-well-Platte) und für 1 bis 1,5h im Brutschrank inkubiert. Mit einer Exzitationswellenlänge von 560nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm wird anschließend am Luminometer (Victor) die Fluoreszenz gemessen.

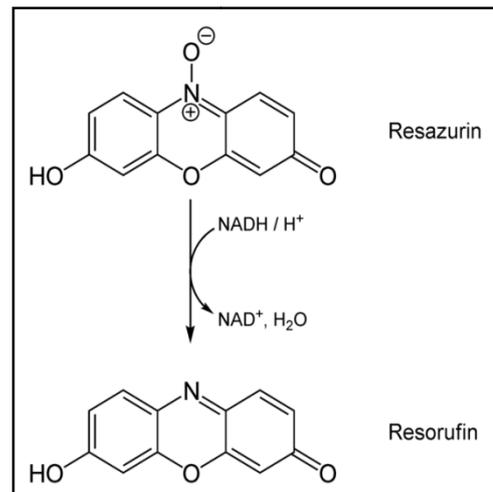


Abbildung 18: Reaktionsschema Resazurin (www.wikipedia.de)

3.6.3 Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test ist abhängig von intakten Lysosomen einer Zelle. Der kationische Farbstoff passiert durch Diffusion die Zellmembran und bindet an die anionische Matrix der Lysosomen. Im sauren Milieu akkumuliert der Farbstoff und kann photometrisch gemessen werden.

Am Abend vorher wird die Neutralrot-Stammlösung (4mg/ml in H₂O) 1:100 mit dem benötigten Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vor Gebrauch wird die Lösung 10min lang zentrifugiert und der Überstand abgekippt, um ungelöste Partikel zu entfernen. Dann wird das alte Medium pro well durch 100µl der Lösung ersetzt und 3 bis 4h im Brutschrank inkubiert. Schließlich wird die Platte zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 100µl/well NR-Lysepuffer 10min auf den Plattenschüttler gestellt. Die Extinktion wird bei 540nm am Victor gemessen.

3.6.4 ATP-Lumineszenz-Assay

Der CellTiterGlo®-Assay von Promega ermöglicht die Bestimmung der ATP-Menge einer Zellprobe, welche proportional zur metabolischen Aktivität und somit proportional zur Zellvitalität ist. Er setzt die Lyse der Zellen und ATP-Freisetzung unter Inaktivierung von Enzymen wie ATPasen voraus. Dann wird die ATP-Menge mit Hilfe einer sehr stabilen, aus dem Gen des *Photuris pennsylvanica* entwickelten Luciferase in ein photometrisch messbares Signal umgesetzt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, benötigt die Luciferase zur Umsetzung von Luciferin in Oxyluciferin nur Mg^{2+} , O_2 und das bereits freigesetzte ATP. Vorteile des CellTiterGlo®-Assay von Promega

sind eine hohe Sensitivität und die schnelle, einfache Durchführbarkeit des Versuchs [90].

Zunächst muss der aufgetaute CellTiter®-Glo Puffer in das lyophilisierte CellTiter®-Glo Substrat überführt und gut gemischt werden. Vom entstandenen Reagenz werden dann $100\mu\text{l/well}$ zum schon vorhandenen Medium dazu pipettiert. Um die Zellen zu lysieren, folgt eine 2-minütige Inkubation auf dem Plattenschüttler. Die Platten werden 10min in einem dunklen Raum stehen gelassen, sodass sich das Lumineszenz-Signal stabilisiert. Nun werden $100\mu\text{l/well}$ auf eine weiße 96-well-Platte pipettiert, um optimale Bedingungen für die anschließende Lumineszenz-Messung zu schaffen.

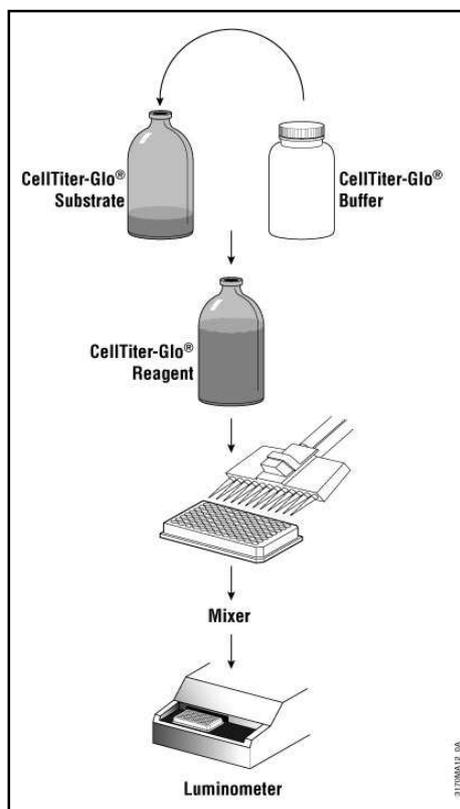


Abbildung 19: Ablauf des CellTiterGlo®-Assays
(www.promega.com)

3.7 Untersuchung der Zellproliferation

3.7.1 Sulforhodamin B-Assay

Allgemeines

Der Sulforhodamin B-Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Proliferation von Zellen. Er basiert auf der Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Zellen einer Probe, welcher linear zur Zellzahl ist. Sulforhodamin B bindet pH-abhängig an die basischen Aminosäure-Seitenketten. Verändert man den pH von sauer zu basisch, löst sich der Farbstoff ab und kann photometrisch gemessen werden [91].

Ablauf

Die Zellen werden auf 96-*well*-Platten mit 5.000 Zellen und 100µl/*well* ausgesät; die geringere Zellzahl als bei den Zytotoxizitätsassays, da sie über einen längeren Zeitraum wachsen sollen. Je Versuch werden immer 8 *wells* gleich behandelt (Bestimmung n=8). Nach der Aussaat benötigen die Zellen einige Zeit, um auf der Platte festzuwachsen. Daher findet die erste Fixierung frühestens nach 12h statt.

Im Folgenden findet die erste Fixierung und die Behandlung der Zellen 12h nach der Aussaat statt. Im Verlauf werden die Platten dann 12h, 24h, 48h, 72h und 96h nach der Behandlung fixiert. Zu diesen Zeitpunkten wird das Medium von den Zellen entfernt und die Platte wird drei Mal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Nun werden die Zellen mit 10%iger Trichloressigsäure (100µl/*well*) mindestens 30min im Kühlschrank fixiert. Danach wird die Säure abgekippt und die Zellen werden nochmals mit NaCl-Lösung mindestens drei Mal gewaschen. Die Platten werden ca. 12h lang unter dem Abzug getrocknet und können dann mehrere Tage im Kühlschrank gesammelt und aufbewahrt werden.

Zur Färbung werden pro *well* 50µl Sulforhodamin B-Lösung aufpipettiert und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden mit 1%iger Essigsäure mehrmals gewaschen, bis sie keine Farbe mehr abgeben und wieder zum Trocknen unter den Abzug gestellt.

Anschließend wird eine ungepufferte Tris-Lösung aufpipettiert (100µl/well), durch welche der pH-Wert ansteigt und der Farbstoff freigesetzt wird. Die Platten werden 5min auf den Plattenschüttler gestellt, sodass in den wells eine homogene Lösung entsteht. Nun wird im Photometer bei 550nm die Extinktion gemessen. Je höher der Messwert ist, desto mehr Zellen sind zum jeweiligen Zeitpunkt gewachsen.

3.8 Tests zur Apoptose

3.8.1 Bestimmung der Caspasen-Aktivität

Lysis der Zellen

Für die Bestimmung der Caspasen-Aktivität werden die Zellen auf 6-well-Platten mit 200.000 Zellen/well ausgesät, sodass sie zum Behandlungszeitpunkt nach 24h zu ca. 70% konfluent sind. Für die Behandlung werden die Inhibitoren in Medium gelöst, welches nur 1% FKS enthält, da 10%iges die Apoptose hemmen könnte.

Da sich apoptotische Zellen häufig von der Kulturschale ablösen, wird das Medium nach 24-stündiger Behandlung abgenommen und in 1,5ml-Cups überführt. Nach Zentrifugation (4.600rpm, 5min) wird der Mediumüberstand verworfen und das Pellet in 1ml Lysispuffer (+DTT) resuspendiert. Die Suspension wird in die Zellkulturschale gegeben, sodass schließlich alle Zellen lysiert werden. Sie können nach 10min Inkubation im Brutschrank leicht abgeschabt werden. Nach einer weiteren Zentrifugation (14.000rpm, 10min), wird der Überstand in neue, auf Eis vorgekühlte Cups überführt. 100µl/Probe werden für die Proteinbestimmung eingefroren.

Messung der Caspasen-Aktivität

Für die Messung der Caspasen-Aktivität wird das DEVD-AFC- bzw. das LEHD-AFC-Substrat verwendet, welches spezifisch für die Effektorcaspasen 3 und 7 bzw. 9 ist. Diese Caspasen erkennen und spalten am C-terminalen Ende des Protein-Substrats. Fluoreszierendes AFC wird frei und kann nach Exzitation mit 390nm bei 510nm photometrisch gemessen werden.

Zunächst wird für den AFC-Standard die AFC-Stammlösung (0,1mg/ml) 1:100 mit Puffer verdünnt. Da die Substratkonzentration von DEVD-AFC im Messansatz 25µM sein soll, muss die Substratstammlösung (10mM) 1:200 mit Lysis-Puffer verdünnt werden. Für die Messung verwendet man eine schwarze 96-well-Platte und pipettiert zuerst die AFC-Standardreihe (AFC-Menge 2,5-100µl, aufgefüllt mit Puffer auf insgesamt 100µl/well). Die Proben werden doppelt pipettiert, möglichst luftblasenfrei mit 50µl/well. Dann wird zu jeder Probe das DEVD (oder LEHD) -AFC-Substrat dazugegeben (50µl/well) und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Der Substratumsatz wird bei 37°C im Fluoreszenzreader in 10min-Intervallen über 1h gemessen.

3.8.2 Protein-Quantifizierung (Bradford-Assay)

Der Bradford-Assay ist ein Test zur Quantifizierung von Proteinen, entwickelt von Bradford, 1976. Dabei werden die Proteine durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 (BIO-RAD) angefärbt, wobei dessen Absorptionsspektrum von 465nm zu 595nm wechselt. Die Absorptionsintensität ist direkt proportional zur Proteinmenge.

Als Bezugsgröße wird folgender BSA-Proteinstandard doppelt pipettiert:

Tabelle 38: BSA-Kalibrierungskurve

Proteinkonzentration [µg/ml]	BSA 5mg /ml H ₂ O [µl]	H ₂ O _{dest} [µl]	Caspase-Lysis- Puffer [µl]
Nullwert	0	900	100
25	5	895	100
50	10	890	100
75	15	885	100
100	20	880	100
125	25	875	100
150	30	870	100
200	40	860	100

Die Proben werden in dreifacher Bestimmung zunächst 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnt. Dann werden je 20µl der Proben oder Proteinstandards mit 1.000µl BIO-RAD (1:5 mit H₂O_{dest} verdünnt) versetzt und gut gemischt. Nach 5min Inkubation bei

Raumtemperatur werden die Proben in Küvetten umgefüllt und zügig gegen den Nullwert bei 595nm gemessen.

3.8.3 Färbung nach Hoechst

Fixierung der Zellen

Die Zellen werden im 24h-Abstand ausgesät und behandelt. Am nächsten Tag werden sie mit PBS gewaschen und 10min in eiskaltem 3%igem Paraformaldehyd/PBS auf Eis fixiert. Nach 5-minütigem Waschen mit PBS wird kurz mit H_2O_{dest} gespült. Die Schalen werden mit Druckluft schnellstmöglich getrocknet und können bei Raumtemperatur gelagert werden.

Färbung mit Hoechst 33258

Nach nochmaligem Waschen mit PBS werden auf jedes *well* 500µl Hoechst 33258-Lösung gegeben und 20min inkubiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und wieder kurz mit H_2O_{dest} gespült. Dann werden sie mit im Wasserbad geschmolzener Glyceringelatine eingedeckelt und können fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Effizienzanalyse und Zytotoxizität der Inhibitoren

In Vorversuchen wurden alle uns zur Verfügung stehenden Inhibitoren für den Wnt- oder den MAPK-Signalweg verwendet. Für den Wnt-Signalweg wurden FH535, PKF 118310, PNU 74654 und iCRT3 getestet, als MAPKK-Inhibitoren U 0126, PD 98059, Sorafenib und Vemurafenib. Hierzu wurden die Zellen für die Gaussia- und Firefly-Luciferase-Messungen auf 24-*well*-Platten, für die Zytotoxizitätsassays mit Alamar Blue und Neutralrot auf 96-*well*-Platten ausgesät. Sie wurden – wie auch bei allen folgenden Versuchen, falls nicht anders vermerkt - jeweils 24h nach der Aussaat mit einem der Inhibitoren behandelt, schließlich wurden nach weiteren 24h die Messungen durchgeführt. Dabei wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Behandlung der Kontrollen erfolgte stets mit dem Lösemittel DMSO.

Am besten senkten FH535, iCRT3, U 0126, Sorafenib und Vemurafenib das Luciferase-Signal. Die Ergebnisse waren in den drei Zelllinien 55.1c, 70.4 und Hepa1c1c7 sehr ähnlich. Vemurafenib ist, wie bereits von unserer Forschungsgruppe herausgefunden, nur bei den 55.1c-Zellen wirksam. In den folgenden zwei Tabellen sind die Konzentrationen, bei welchen eine Signalhemmung auf mindestens 50% des Ausgangswertes gemessen werden konnte, in 55.1c gezeigt. In Klammern ist die ungefähre prozentuale Signalaktivität im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Für die anderen beiden Zelllinien ergaben sich ähnliche Werte. Höhere Konzentrationen konnten jeweils keine stärkere Hemmung bewirken. Mit den angegebenen Konzentrationen wurde daher bei allen Versuchen, falls nicht anders vermerkt, gearbeitet. Ausreißer wurden im Folgenden immer mit dem Grubbs-Test eliminiert. In der rechten Spalte der Tabellen ist die Konzentration angegeben, bei welcher der Inhibitor zytotoxisch wirkte, d. h. die Zellvitalität sank auf <75% im Vergleich zur Kontrolle. Für die Ergebnisse der Zelllinien 70.4 und Hepa1c1c7 siehe Tabelle 42-45 im Anhang.

Tabelle 39: Konzentration Wnt-Signalweg-Inhibitoren in 55.1c

Wnt- Signalweg-Inhibitoren	Konzentration des Inhibitors (STF-Signal-Senkung)	Zytotoxizität
FH 535	15µM (auf 40%)	120µM
iCRT3	20µM (auf 40%)	90µM

Tabelle 40: Konzentration MAPKK-Inhibitoren in 55.1c

MAPKK-Inhibitoren	Konzentration des Inhibitors (Gaussia-AP1-Signal-Senkung)	Zytotoxizität
Sorafenib	5µM (auf 25%)	7µM
Vemurafenib	10µM (auf 30%)	40µM
U 0126	20µM (auf 50%)	170µM

4.2 Interaktionen zwischen dem Wnt- und dem MAPK-Signalweg

4.2.1 Analyse auf der Ebene der Transkription

Firefly-Luciferase-Reporterassays

Um die Aktivität des freien β -Catenins bzw. die Aktivität von Erk1/2 zu untersuchen, wurden die Zellen – ausgenommen die stabil-transfizierten 70.4K15 und 55.1cK53 - 24h vor der Behandlung transient mit den Reporter-Plasmiden transfiziert. Bei den MAPKK-inhibierten Zellen wurde für den Wnt-Signalweg das *Firefly*-STF-Luciferase-Signal, bei den Wnt-inhibierten Zellen das *Gaussia*-AP1-Luciferase-Signal gemessen. Durch die Normierung auf *Renilla*-Luciferase oder auf Alamar Blue konnten Verzerrungen durch unterschiedliche Transfektionseffizienz oder unterschiedliches Zellwachstum reduziert werden. Die Werte – bezogen auf *Renilla* oder Alamar Blue – unterschieden sich nur gering. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier stets nur ein Bezugswert abgebildet, immer in Relation zur unbehandelten Kontrolle.

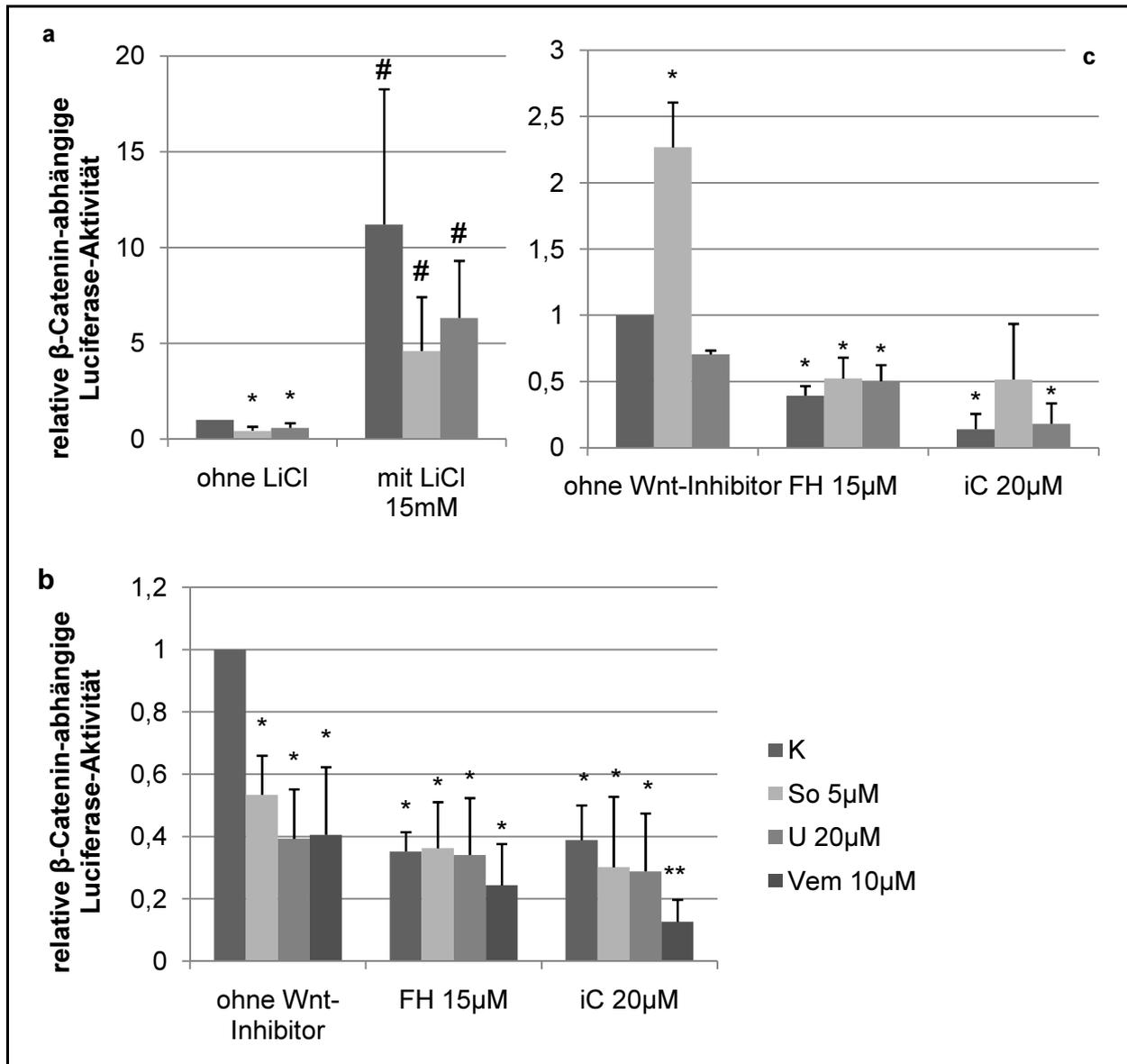


Abbildung 20: Relative Firefly-Luciferase-Aktivität, normiert auf Alamar Blue, in (a) 70.4STFK15 und (b) 55.1cSTFK53 nach Behandlung im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (K). Signifikante Signalmindering (*) durch die MAPKK-Inhibitoren Sorafenib (So), U 0126 (U) und Vemurafenib (Vem), in 55.1c auch durch die Wnt-Inhibitoren FH535 (FH) und iCRT3 (iC) im Vergleich zur Kontrolle. In 70.4K15 mit LiCl Signifikanz im gepaarten T-Test (#), nicht im ungepaarten, da Induktion in den verschiedenen Versuchen unterschiedlich stark (4-22fach). In 55.1c mit iCRT3+Vemurafenib signifikante Signalsenkung () im Vergleich zu iCRT3 allein. (c) Relative Firefly-Luciferase-Aktivität, normiert auf Renilla, in Hepa1c1c7. Signifikante Induktion durch Sorafenib, Reduktion durch U 0126, signifikante Reduktion durch FH535 und iCRT3 im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen in je 3 technischen Replikaten, mit der Standardabweichung. $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).**

Wie in Abbildung 20 gezeigt, sank den Zelllinien 70.4K15 das *Firefly*-Luciferase-Signal, also die β -Catenin-Aktivität, unter MAPKK-Inhibitor-Behandlung signifikant. Da die 70.4K15-Zellen ohne *Ctnnb1*-Mutation an sich eine geringe β -Catenin-

Aktivität aufweisen, wurde diese mit LiCl induziert. Auch unter β -Catenin-Induktion ergab sich mit den MAPKK-Inhibitoren Sorafenib und U0126 eine deutliche Reduktion der β -Catenin- Aktivität. Auch bei den 55.1cK53-Zellen sank die *Firefly*-Luciferase-Aktivität durch MAPKK-Inhibitoren signifikant. Wurde hier zusätzlich der Wnt-Signalweg gehemmt, senkte dies das Signal um maximal 20% weiter ab. Bei den Hepa1c1c7-Zellen induzierte der MAPKK-Inhibitor Sorafenib das *Firefly*-Signal signifikant, U0126 hingegen senkte es. Zusammen mit den Wnt-Inhibitoren wurde das Signal wieder gesenkt.

Gaussia-Luciferase-Reportergenassays

Die *Gaussia*-AP1-Reportergen-Analyse ergab wenig deutliche Ergebnisse mit höheren Standardabweichungen, obwohl die Versuche wie die obigen fünfmal durchgeführt wurden. Insgesamt ließ sich in 70.4 und 55.1c unter Wnt-Inhibition mit FH535 und iCRT3 ein Absinken des *Gaussia*-AP1-Signals auf 50-80% beobachten, was teilweise signifikant war. In den Hepa1c1c7-Zellen senkte nur iCRT3 das Signal. Unter zusätzlicher Wnt-Inhibition wurde das Signal in 70.4 mit Sorafenib deutlich weiter abgesenkt, in 55.1c nicht, in Hepa1c1c7 sowohl mit U0126 als auch Sorafenib deutlich gesenkt. Die entsprechenden Diagramme sind im Anhang gezeigt (Abb. 34).

Anschließend wurde, aufgrund der hohen Standardabweichungen, im selben Versuch einmalig der TSm-Reporter eingesetzt. Hierbei war die Transfektionseffizienz etwas besser als bei *Gaussia*-AP1 und das Signal sank ebenfalls unter Wnt-Inhibition. Hier konnte durch die Wnt-Inhibitoren sogar eine Inhibition des Signals auf 1-30% beobachtet werden. Siehe Abb. 35 im Anhang.

4.2.2 Untersuchung auf mRNA-Ebene

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die Signalwege genauer zu ermitteln, wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression untersucht. Als Zielgene des Wnt-Signalwegs wurden Axin2 und Gpr49, als Zielgene der MAPKK Fos und Egr1 ausgewählt.

In der Zelllinie 70.4 waren Axin2 und Gpr49 unter Wnt-Inhibitoren-Behandlung reduziert, jedoch nicht so deutlich wie das Luciferase-Signal. Die MAPKK-Inhibition

lieferte hier ein unverändertes Signal bzw. sogar eine Signalinduktion (vor allem Gpr49 unter Sorafenib in 70.4). Die MAPKK-Zielgene Fos und Egr1 waren unter Wnt- und MAPKK-Inhibitor-Behandlung meist signifikant reduziert.

In 55.1c zeigte sich für Axin2 kein eindeutiges Ergebnis, die Gpr49-mRNA-Expression wurde durch alle Inhibitoren, bis auf Sorafenib, signifikant reduziert. Die MAPK-Zielgen-Analyse ergab hier durch die Wnt-Inhibitoren eine Reduktion der mRNA, bei den anderen Inhibitoren ergab sich jedoch eine hohe Standardabweichung.

In Hepa1c1c7 kam es wie erwartet zur signifikanten Reduktion der Axin2- und der Gpr49-mRNA-Expression unter Wnt-Inhibitoren-Behandlung. Sorafenib induzierte die Expression der β -Catenin-Zielgene. Die Fos- und Egr1-mRNA-Expression war sowohl bei MAPKK-Inhibitor- als auch bei Wnt-Inhibitor-Behandlung eher reprimiert, jedoch aufgrund der Standardabweichungen oft nicht statistisch signifikant.

Für die Diagramme von 70.4 und Hepa1c1c7 siehe Anhang.

4.2.3 Bead-basierter Protein-Array

Zur Ermittlung der Mengen einiger wichtiger Proteine des β -Catenin-Wegs wurden, in Kooperation mit Nicola Groll (NMI, Reutlingen), Bead-basierte Proteinmengenanalysen durchgeführt. Dabei binden für verschiedene Proteine spezifische Beads über einen Antikörper an die unterschiedlichen β -Catenin-Formen. Daraufhin dockt ein fluoreszierender Antikörper an den gebundenen Bead an. Über spezielle Fluoreszenz-Farbcodes können die Proteine dann quantifiziert werden [92].

Hierzu wurden die Zellen wie gehabt behandelt und jeweils 6h und 24h nach der Behandlung fixiert. Nach 6h waren noch keine deutlichen Proteinmengen-Veränderungen erkennbar, jedoch nach 24h. In allen Zelllinien (70.4, 55.1c und Hepa1c1c7) erkannte man eine Reduktion sowohl des gesamten β -Catenins, als auch des aktiven, nicht phosphorylierten β -Catenins unter jeder Einzel-Inhibitor-Behandlung und auch unter Doppelbehandlung. In allen drei Zelllinien kam es unter Behandlung zur signifikanten Mengenreduktion des kleinen Proteins Icat, welches die β -Catenin-vermittelte Transkription inhibiert. Außerdem war die Menge an Casein

Kinase, welche unter anderem Teil des β -Catenin-Destruktionskomplexes ist, unter FH535- wie auch unter den Kombinationsbehandlungen signifikant vermindert. In Abbildung 21 ist beispielhaft die Auswertung der Zelllinie 70.4 gezeigt. Die Diagramme der Zelllinien 55.1c und Hepa1c1c7 sind im Anhang abgebildet (Abb. 37 und 38). Insgesamt lässt sich also in der Proteinquantifizierung unter Behandlung eine Abnahme des gesamten, des aktiven β -Catenins, des Proteins Icat sowie tendenziell auch der Casein Kinase feststellen.

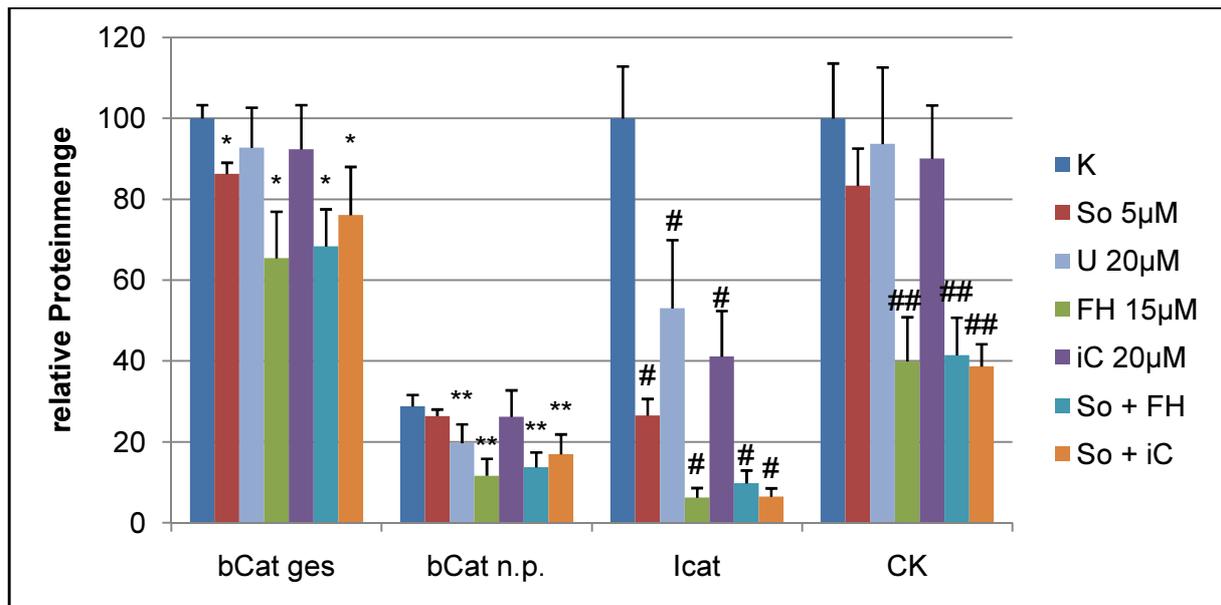


Abbildung 21: Darstellung der vorhandenen Proteinmengen in 70.4. Dargestellt sind über Fluoreszenz gemessene, relative Mengen an gesamtem β -Catenin (bCat ges), nicht-phosphoryliertem β -Catenin (bCat n.p.), beide bezogen auf die Kontrolle des gesamten β -Catenins, das Protein Icat und die Casein Kinase (CK). (*) Signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle von bCat ges, (**) signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle von bCat n.p., (#) signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle von Icat, (##) signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle der CK. $p \leq 0,05$ (Student's T-Test). Versuch in 3fach-Bestimmung.

4.3 Doppelinhibition des Wnt- und des MAPK-Signalwegs

4.3.1 Zytotoxizitätsassays

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Effekt der simultanen Inhibition des Wnt- und des MAPK-Wegs untersucht werden. Dazu wurde zunächst das Ausmaß der Zytotoxizität

unter Doppelinhibition im Vergleich zur Einzelinhibition untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Doppelinhibition einen verstärkt zytotoxischen Effekt zeigt, und ob dieser lediglich auf die Summe der Zytotoxizität von zwei Inhibitoren zurückzuführen ist oder ob der Effekt zweier Inhibitoren auf die Zellvitalität doch mehr ist als ein rein additiver. Das wäre ein Hinweis darauf, dass es einen therapeutischen Nutzen haben könnte, den Wnt- und den MAPK-Signalweg gleichzeitig zu hemmen.

Hierzu wurden die drei Zelllinien 70.4, 55.1c und Hepa1c1c7 mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen und die Hälfte der Zellen einer 96-well-Platte zusätzlich mit dem Wnt-Inhibitor FH535 bzw. iCRT3 in fester, nicht-zytotoxischer Konzentration behandelt (Konzentrationen entsprechend Kapitel 4.1). Die Zytotoxizitätskurve beider Behandlungen, wie in Abbildung 22 beispielhaft für 70.4 gezeigt, verlaufen annähernd sigmoidal. Es ergab sich, vor allem bei Sorafenib-Konzentrationen zwischen 1 und 10 μ M, eine deutliche Zytotoxizitätsdifferenz zwischen Einzel- und Doppelbehandlung. Durch Zugabe eines Wnt-Inhibitors, welcher alleine nicht zytotoxisch wirkt, kam es also zur starken Vitalitätsminderung der Mausleberzellen.

Entsprechend wurde der Versuch auch mit iCRT3- bzw. FH535-Gradient mit und ohne Sorafenib in fester Konzentration durchgeführt. Die Sorafenib-Zugabe senkte die Zytotoxizitätskurve ebenfalls deutlich. Beim iCRT3-Gradienten war der Effekt vor allem bei höheren iCRT3-Konzentrationen (50-200 μ M) sehr ausgeprägt. Beim FH535-Gradienten war eher bei niedrigen Konzentrationen (1-10 μ M) ein deutlicher Zytotoxizitätsunterschied erkennbar.

Es konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von Sorafenib zu einem Wnt-Inhibitor meist eine größere Zytotoxizitätsdifferenz erzielte als die Zugabe eines Wnt-Inhibitors zu Sorafenib.

Das Ergebnis war in allen drei Zelllinien ähnlich.

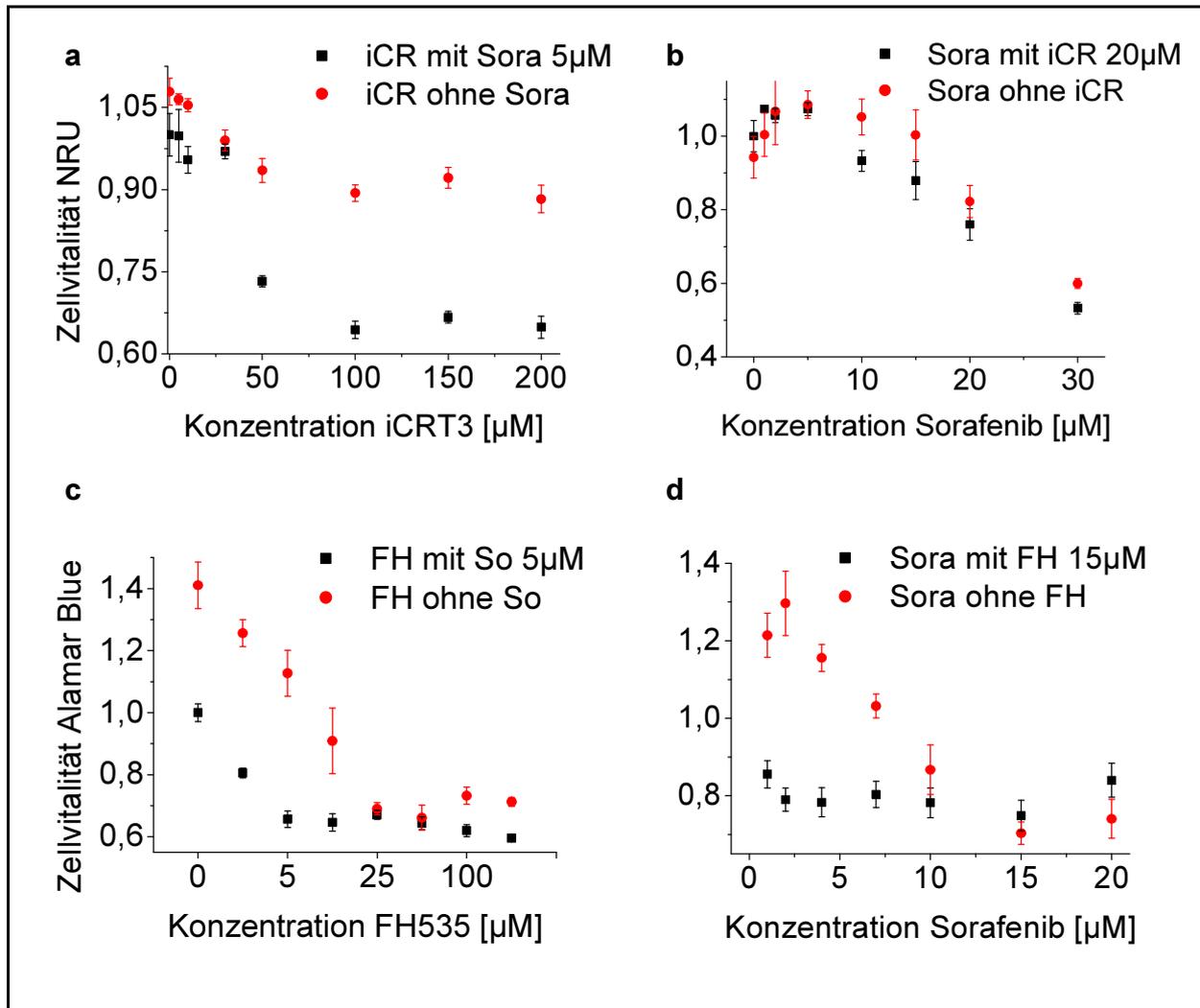


Abbildung 22: Relative Zellvitalität, ermittelt mit Neutralrot (NRU) bzw. Alamar Blue in 70.4. Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung, ermittelt nach 6fach-Bestimmung. a) zeigt die Behandlung mit iCRT3-Konzentrationsgradient mit (schwarz) und ohne (rot) Sorafenib (So/Sora), unter Doppelbehandlung ergibt sich vor allem bei höheren iCRT3-Konzentrationen ein Vitalitätsunterschied von bis zu 30%. b) zeigt den Sorafenib-Gradienten mit und ohne iCRT3, hier sind die Vitalitätsunterschiede nicht so groß. c) und d) zeigen FH535- bzw. Sorafenib-Gradient mit und ohne zusätzlichen Inhibitor für den jeweils anderen Signalweg. Die Zytotoxizitätskurven verlaufen annähernd sigmoidal. Zwischen Einzel- und Doppelbehandlung ergeben sich Vitalitätsunterschiede von bis zu 50% bei 2 μM Sorafenib.

Für die sechs- bis neunmalige Versuchswiederholung wurden, um den Versuchsaufbau nun zu vereinfachen und die Standardabweichung zu minimieren, jeweils zwei Konzentrationen des Gradienten ausgewählt, bei welchen der Unterschied zwischen Einzel- und Doppelbehandlung am größten war. Die Zytotoxizität wurde jeweils mit drei Methoden - Alamar Blue, Neutralrot und ATP-Bestimmung - ermittelt.

In allen Zelllinien war das Ergebnis vergleichbar: Allein haben weder die Wnt-Inhibitoren, noch Sorafenib einen starken Effekt auf die Zellvitalität. In Kombination jedoch fiel die Zellvitalität im Vergleich zur Einzelbehandlung deutlich ab. Vor allem die Kombinationsbehandlung Sorafenib mit FH535 wies in allen Tests einen signifikanten Effekt auf. In den folgenden drei Diagrammen sind beispielhaft die Ergebnisse der Zelllinie 55.1c abgebildet. Die entsprechenden Diagramme der Linien 70.4 und Hepa1c1c7 sind im Anhang zu finden.

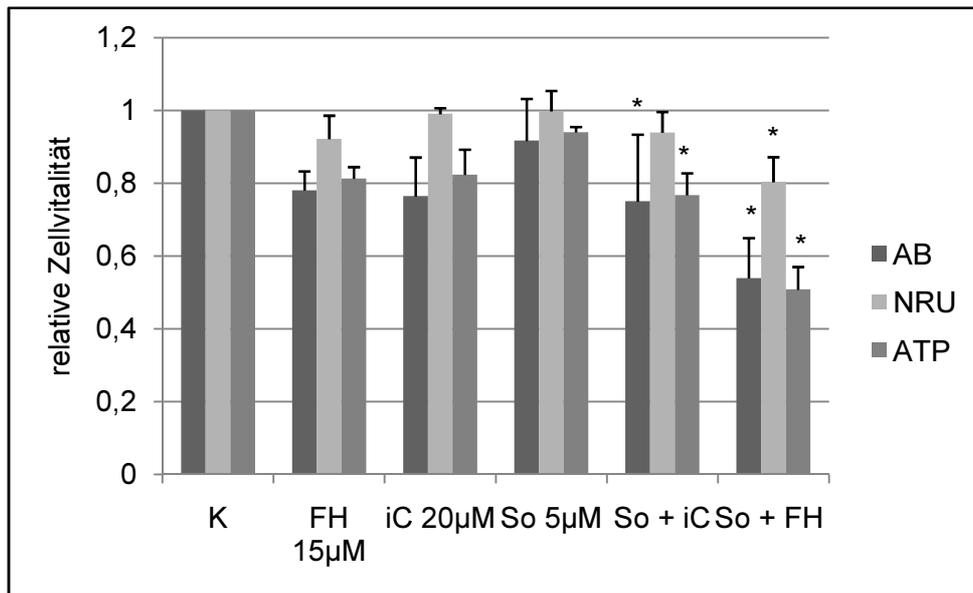


Abbildung 23: Relative Zellvitalität, Zelllinie 55.1c. Abgebildet ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Versuchen, jeweils in 6facher Bestimmung. Ermittelt mit Alamar Blue (AB), Neutralrot (NRU) und ATP-Assay (ATP). Die Kombinationsbehandlung Sorafenib 5µM + iCRT3 20µM senkt die Vitalität deutlich, teilweise signifikant (*) im Vergleich zu Sorafenib 5µM. Sorafenib 5µM + FH535 15µM senkt die Vitalität in allen drei Tests signifikant im Vergleich zu Sorafenib 5µM. $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

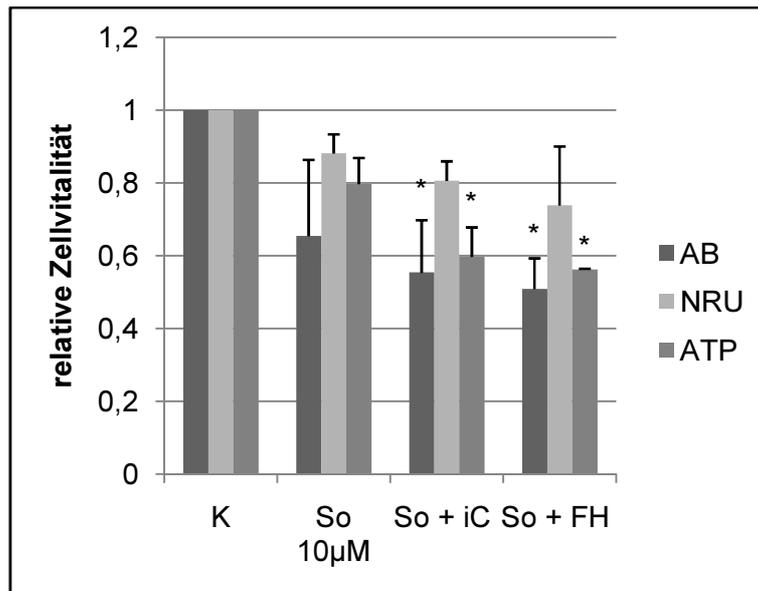


Abbildung 24: Relative Zellvitalität, 55.1c. Ergebnis aus 5 Versuchen mit 6fachen Replikaten. Mit 10µM Sorafenib + 20µM iCRT3 bzw. 15µM FH535 deutliches Absinken der Zellvitalität, vor allem im Test mit Alamar Blue und dem ATP-Assay. Signifikanz im Vergleich zu Sorafenib 10µM (*), $p \leq 0,05$ (*Student's T-Test*).

In 55.1c zeigt also sowohl der MAPKK-Inhibitor Sorafenib in 5µM als auch in 10µM, durch Kombination mit FH535 eine signifikante Zytotoxizitätssteigerung im Vergleich zu Sorafenib allein. Umgekehrt ergab sich auch bei Wnt-Inhibition mit iCRT3 oder FH535 in einer nicht-zytotoxischen und einer zytotoxischen Konzentration jeweils mit Sorafenib (nicht-zytotoxisch) ein deutlicher Unterschied in der Zytotoxizität.

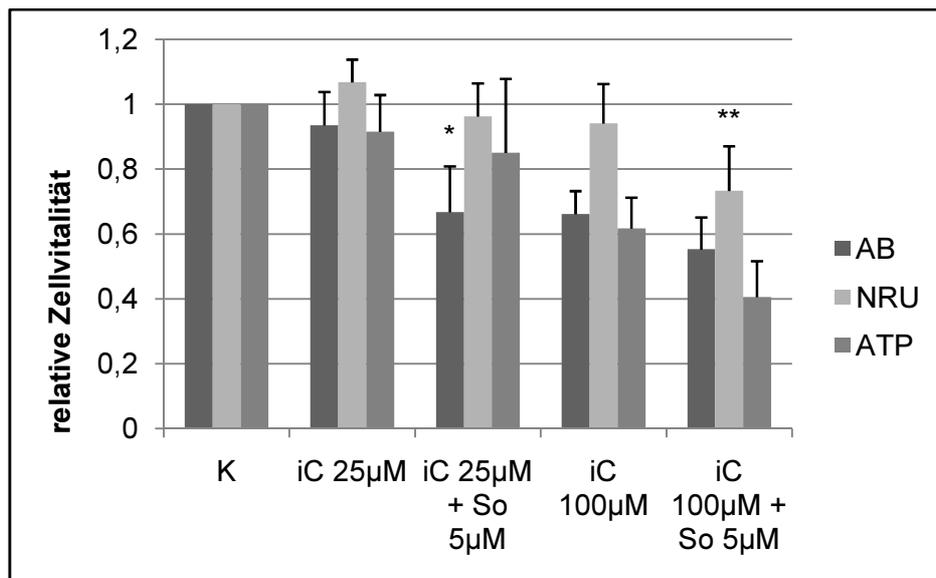


Abbildung 25: Relative Zellvitalität, 55.1c. Ergebnis aus 5 Versuchen mit 6fachen Replikaten. Sowohl bei iCRT3 25µM als auch 100µM reduziert die Zugabe von Sorafenib die Vitalität. Signifikanz im Vergleich zu iC 25µM (*), Signifikanz im Vergleich zu iC 100µM (**). $p \leq 0,05$ (*Student's T-Test*).

4.3.2 Sulforhodamin B-Proliferationsassays

Nachdem die Doppelbehandlung in den Zytotoxizitätsassays also deutliche Wirkung auf die Zellvitalität innerhalb von 24h zeigte, sollte nun die entscheidende Frage geklärt werden, inwiefern sich dieser Effekt über einen längeren Zeitraum hinweg auswirkt.

Hierzu wurden die Zellen auf mehreren 96-*well*-Platten ausgesät, nach 12h mit den Inhibitoren unterschiedlich behandelt (Konzentrationen aus Kapitel 4.1) und über 5 Tage zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert (nach 12, 24, 36, 48, 72 und 96h). Es ergaben sich näherungsweise sigmoidale Proliferationskurven.

Bei der Zelllinie 70.4 hemmten, vor allem gegen Ende der 5 Tage, schon die Inhibitoren FH535 und insbesondere U0126 allein die Proliferation auf ca. ein Drittel im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung Sorafenib mit iCRT3 unterdrückte das Wachstum noch stärker und vor allem Sorafenib mit FH535 hemmte die Proliferation bei beiden Zelllinien fast komplett.

In 55.1c ergab sich ein ähnliches Bild, außer dass mit FH535 und U0126 alleine die Proliferation nicht so stark gehemmt wurde. Auch hier hemmte Sorafenib mit FH535 die Proliferation nahezu vollständig. Es erfolgte zusätzlich die Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Vemurafenib. Auch wenn Vemurafenib die Proliferation allein nur wenig hemmte, reduzierten die Kombinationsbehandlungen Vemurafenib mit iCRT3 oder Vemurafenib mit FH535 das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nach 5 Tagen um mindestens ein Drittel. Wie auch bei Zelllinie 70.4 zeigte hier die Behandlung mit Sorafenib und FH535 den eindeutig stärksten Effekt.

In Hepa1c1c7 war der Effekt dem in 70.4 sehr ähnlich. FH535 und U0126 und Sorafenib + iCRT3 reduzierten die Proliferation auf ca. ein Drittel im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination Sorafenib mit FH535 hemmte die Proliferation nahezu vollständig, noch ausgeprägter als in Zelllinie 70.4.

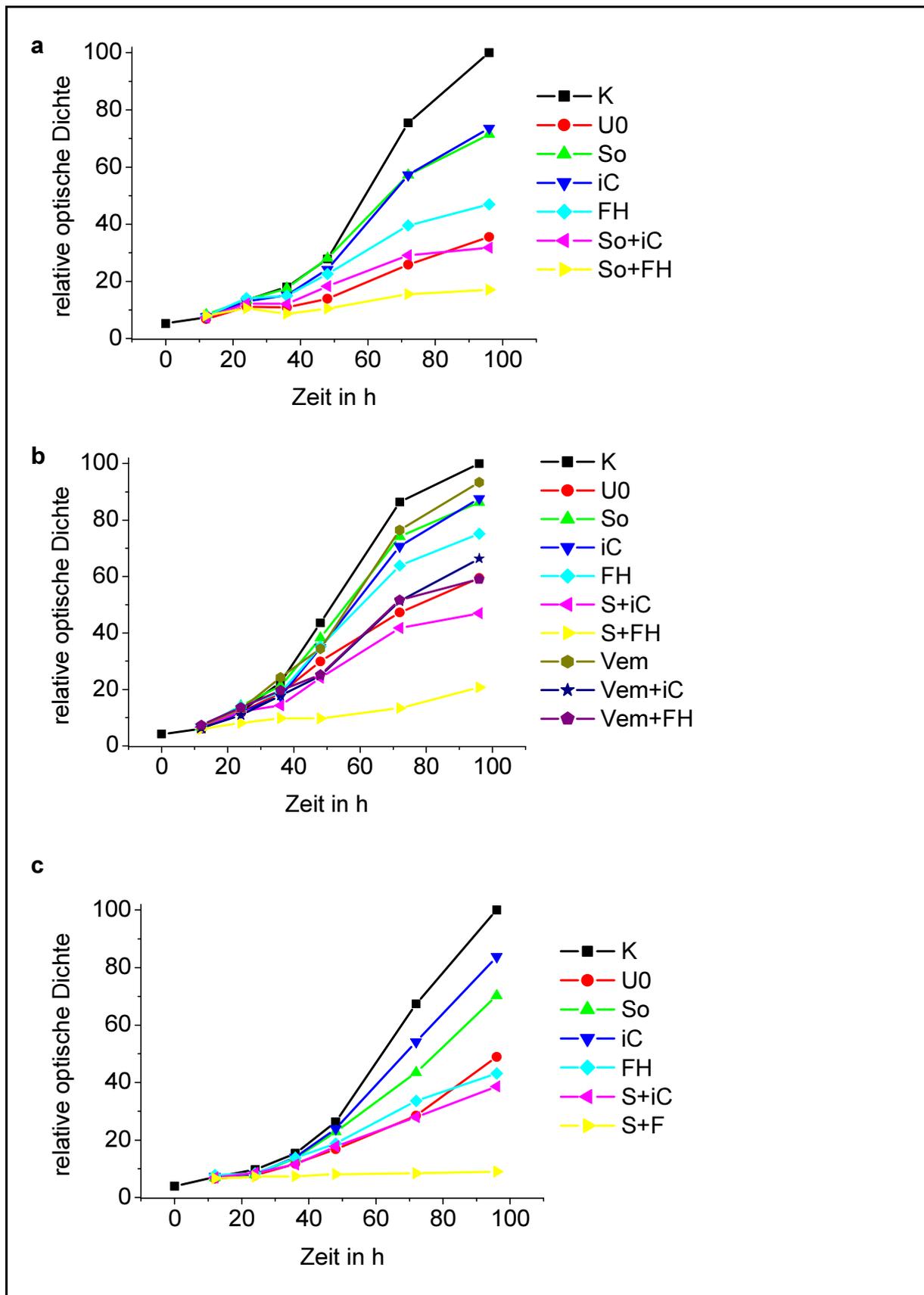


Abbildung 26: Proliferationskurven von a)70.4 b)55.1c und c)Hepa1c1c7 unter verschiedenen Behandlungen. Die Proliferation entspricht der relativen optischen Dichte, gemessen mittels Fluoreszenz. Behandlungen: K=unbehandelte Kontrolle, U0=U0126 20 μ M, So=Sorafenib 5 μ M,

iC=iCRT3 20 μ M, FH=FH535 15 μ M, Vem=Vemurafenib 10 μ M. Über einen Zeitraum von 96h hemmen alle Inhibitoren das Zellwachstum, am stärksten wirken jedoch in allen Zelllinien die Kombibehandlungen Sorafenib + iCRT3 und vor allem Sorafenib + FH535. Der Versuch wurde dreimal in 8fach-Bestimmung durchgeführt, die Standardabweichung beträgt meist 1-10% und ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

4.3.3 Caspase-Aktivität

Infolge der Erkenntnis, dass die Doppelbehandlungen die Zellvitalität und das Wachstum beträchtlich hemmen, sollte nun herausgefunden werden, auf welche Art die Zellen dabei zugrunde gehen. Um zu testen, ob die Zellen apoptotisch sterben, wurde die Aktivität zweier Caspasen untersucht. Hierbei wurden die Caspase 3, eine über den extrinsischen Weg aktivierte Effektorcaspase, und die Caspase 9, eine Initiatorcaspase des mitochondrialen Aktivierungswegs, betrachtet.

Die Zellen wurden auf 6-well-Platten ausgesät, nach 24h mit den Inhibitoren (Standardkonzentrationen) in 1% FKS-Medium 24h lang behandelt und anschließend lysiert. Die Messung lief über 1h in 10min-Abständen, wobei die optische Dichte des freiwerdenden, fluoreszierenden AFC photometrisch aufgezeichnet wurde. Daraus ergab sich für jede Zelllinie und Behandlungsart jeweils eine annähernd lineare Kurve. Die Steigung dieser Kurve ist, im relativen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, repräsentativ für die Caspase-Aktivität unter der jeweiligen Behandlung.

Ein im Anhang gezeigtes Diagramm (Abbildung 45) zeigt beispielhaft den photometrisch messbaren linearen Anstieg von AFC im Messzeitraum von 1h für die Hepap1c1c7-Zellen, Caspase 3.

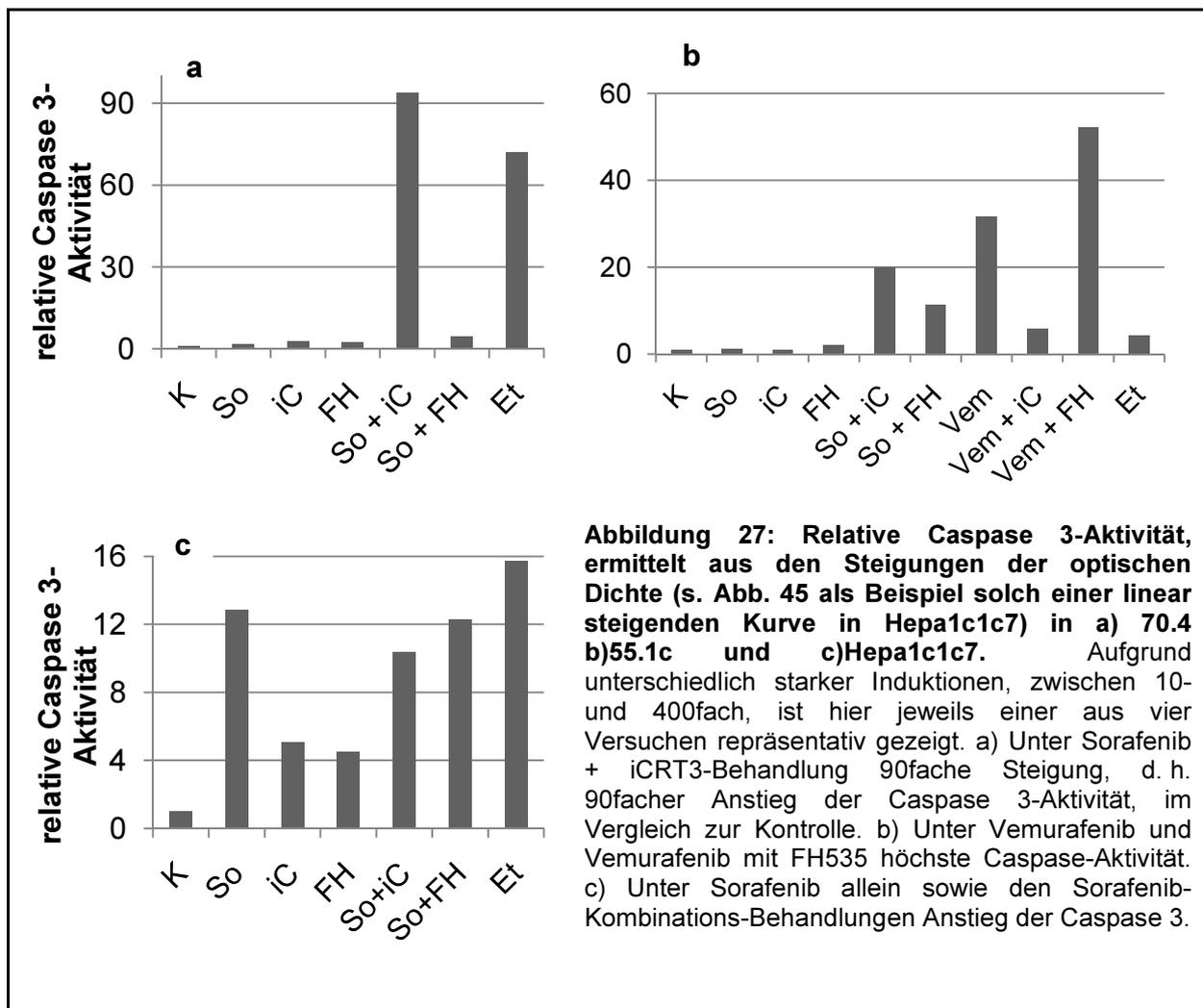
Die Caspase 3 war in allen vier Versuchsdurchläufen in der Zelllinie 70.4 bei der Kombinationsbehandlung Sorafenib mit iCRT3 um bis zu 400fach gegenüber der Kontrolle erhöht, während sie bei Sorafenib mit FH535 nur gering erhöht war.

In der Zelllinie 55.1c war die Caspase 3-Aktivität bei der Kombinationsbehandlung Sorafenib mit iCRT3 ebenfalls deutlich erhöht (10-20fach im Vergleich zur Kontrolle), bei Sorafenib mit FH535 halb so hoch. Auch Vemurafenib und besonders Vemurafenib mit FH535 steigerten die Caspase 3-Aktivität auf das 30-50fache.

In Hepa1c1c7 hingegen zeigte sich eine Erhöhung der Caspase 3-Aktivität vor allem unter Einzel-Sorafenib-Behandlung und bei Sorafenib mit FH535.

Ob und wie stark die Effektorcaspase 3 aktiviert wird, hängt also zum einen von der Behandlungsart, zum anderen von der Zelllinie ab. Grundsätzlich wird sie jedoch besonders bei Doppelbehandlung häufig beobachtet.

Im Folgenden ist jeweils ein Versuch repräsentativ dargestellt, da sich bei Zusammenfassung aller vier Versuchsdurchläufe durch unterschiedlich starke Induktion hohe Standardabweichungen ergaben. Beispielsweise schwankte die Caspase 3-Aktivität unter Behandlung mit Sorafenib und iCRT 3 in 70.4 zwischen 20- und 400fach, in 55.1c zwischen 20- und 50fach. Die Tendenz, unter welchen Behandlungen die Caspase-Aktivität anstieg, war bei den gezeigten Fällen jedoch in jedem Versuch dieselbe.



Die Caspase 9-Aktivität war in Linie 70.4 ebenfalls bei Sorafenib-iCRT3-Kombinationsbehandlung deutlich erhöht, allerdings nur 2fach bis 16fach. In 55.1c ergab sich vor allem bei Sorafenib-FH535-, Vemurafenib- und Vemurafenib-FH535-Kombinationsbehandlung eine Induktion auf das 3fache. In Hepa1c1c7 war die Caspase 9-Aktivität nur leicht erhöht, am meisten bei Sorafenib mit FH535. Für die entsprechenden Beispieldiagramme siehe Abb. 46 im Anhang.

4.3.4 Zellbilder und Hoechst-Färbung

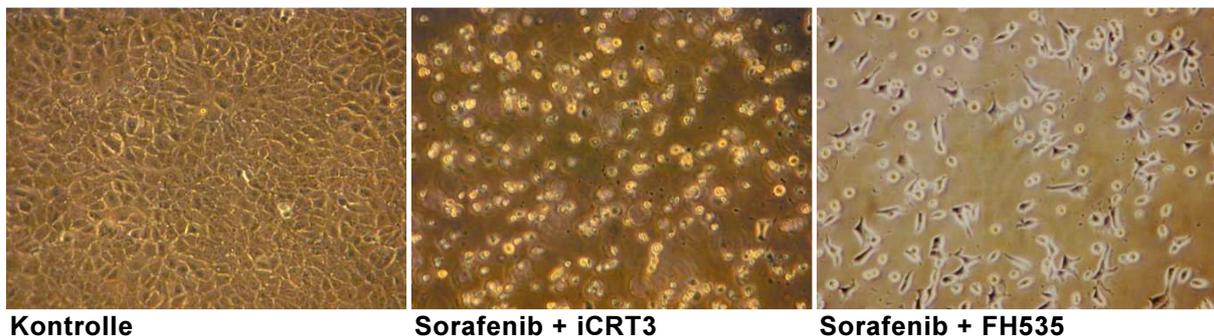


Abbildung 28: Fotos der behandelten Zellen Hepa1c1c7 nach 24h, im 10er-Objektiv. Unter Sorafenib + iCRT3-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kaum vitale Zellen sichtbar. Unter Sorafenib + FH535-Behandlung sterben ungefähr der Hälfte aller Zellen, diese sind von der Platte gelöst und abgekugelt.

Schon in der mikroskopischen Kontrolle nach 24-stündiger Behandlung, bevor die Zellen für die Caspasenmessung lysiert wurden, zeigte sich ein eindeutiges Bild: Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Vitalität, die Anzahl an toten, abgelösten Zellen und die Konfluenz unter Sorafenib-Behandlung unverändert bis gering verschlechtert. Unter alleiniger Vemurafenib-Behandlung war die Anzahl toter Zellen etwas höher. Bei den Kombinationsbehandlungen erkannte man im Vergleich zur Kontrolle jedoch einen starken Unterschied: Wie oben abgebildet, starben vor allem unter Doppelbehandlung mit Sorafenib und iCRT3 optisch betrachtet nahezu alle Zellen ab. Sie waren alle von der Platte abgelöst, abgekugelt, in ihrer Zellstruktur verändert und in der Anzahl verringert. Auch bei der Kombinationsbehandlung Sorafenib und FH535 verringerte sich die Anzahl der Zellen deutlich, über 50% der Zellen waren tot, einige mehr hafteten jedoch noch an der Platte. D. h. man erkannte schon rein mikroskopisch, dass die Zellen in ihrer Proliferation gehemmt wurden und

dass der Großteil der Zellen abstarb. In den vorhergehenden Alamar Blue-, Neutralrot- und ATP- Messungen, s. Kapitel 4.1 und 5.3.1 war die Zellvitalität nicht so stark reduziert wie hier. Eine Erklärung dafür könnte der Unterschied zwischen 10% und dem hier verwendeten 1%igem FKS im Medium sein.

Um die Zellen, die durch Apoptose sterben, besser darzustellen, wurden diese mit Hoechst-Lösung gefärbt, welche in die DNA interkaliert. Die Behandlungsdauer der Zellen wurde hier auf ca. 20h verkürzt, damit noch nicht so viele Zellen abgelöst sind, welche beim Waschen mit PBS abgespült werden würden. In der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich apoptotische Zellen gut erkennen: Die Kerne sind rund, kleingeschrumpft, das Chromatin kondensiert und somit verdichtet, später kommt es zur Fragmentierung der DNA und des Kerns.

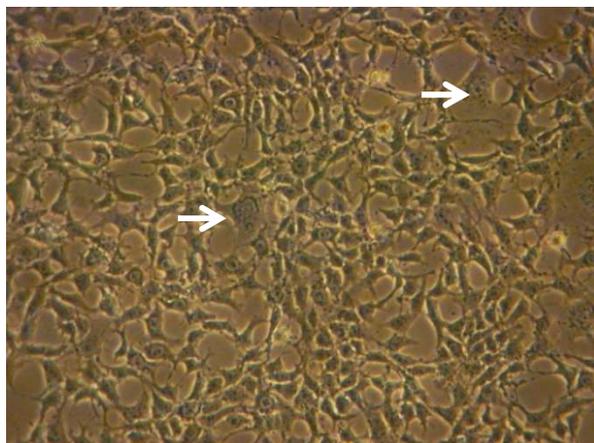
Es ließen sich in allen Zelllinien unter Doppelbehandlung einige apoptotische Zellkerne erkennen. Jedoch waren, im Vergleich zur einfachen mikroskopischen Kontrolle nach 24h Behandlung und in Betracht der hohen Caspasenaktivität, eher wenige apoptotische Zellen sichtbar. Bei den Zelllinien 70.4 und 55.1c waren große Felder frei von Zellen, viele waren bereits abgelöst und wurden beim Waschen weggespült. Möglicherweise könnte man die Trefferquote an apoptotischen Zellen durch kürzere Behandlungsdauer, d. h. frühere Fixierung, erhöhen.

4.4 Sorafenib-resistente Zellen

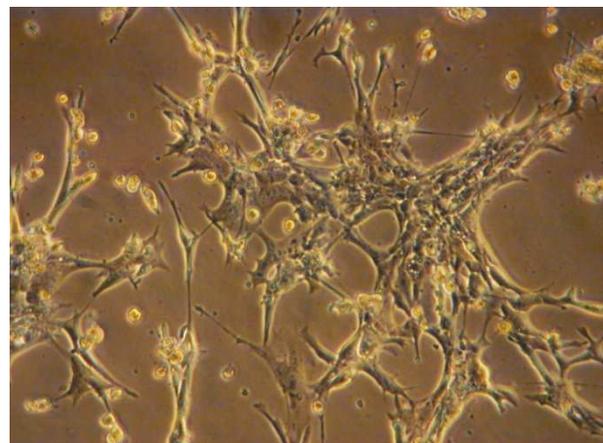
4.4.1 Anzucht Sorafenib-resistenter Zellen

Menschliche HCC-Zellen sind bei der Therapie über einen längeren Zeitraum - von Wochen bis Monaten - dem Medikament Sorafenib ausgesetzt. Nach einiger Zeit zeigt die Therapie jedoch nicht mehr den anfänglichen, zytotoxischen Effekt. Um die Auswirkungen einer längeren Sorafenib-Behandlung zu untersuchen und um zu testen, ob auch Mausleberzellen unter Langzeitbehandlung Resistenzen entwickeln, wurden die Zelllinien 70.4, 55.1c und Hepa1c1c7 über mehrere Wochen kontinuierlich mit Sorafenib behandelt. In der ersten Woche wurden sie einer 5µM-Behandlung ausgesetzt, in der zweiten Woche 6µM usw. bis eine Konzentration von

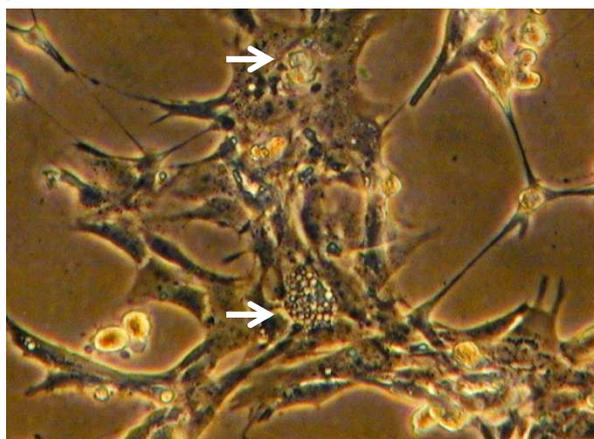
10µM erreicht war, welche bei den ursprünglichen Zellen zytotoxisch war. Die Linie 70.4 starb in der 2. Behandlungswoche der Dauerbehandlung vollständig ab. Bei den anderen beiden Zelllinien gingen stets zahlreiche Zellen zugrunde und die Proliferation war deutlich gehemmt, sodass die Zellen zeitweise nur alle zwei Wochen trypsinisiert werden konnten. Außerdem veränderte sich die Form der Zellen deutlich. Die Zellmembran bildete weite Ausläufer - ähnlich alternden Zellen, welche schon zu lange in zu hoher Passage in Kultur sind. Außerdem war das Zytoplasma vieler Zellen gefüllt mit Vakuolen, welche Zeichen für einen veränderten Stoffwechsel sein können oder auch der osmotischen Regulation dienen. Zeichen für eine Stoffwechselveränderung war außerdem die stets schnelle Farbveränderung frisch aufpipettierten Mediums von orange nach tiefgelb.



a



b



c

Abbildung 29: Fotos der resistenten Zellen im 10er-Objektiv. a) Hepa1c1c7R: Die Zellen bilden weite Ausläufer der Zellmembran. Einige wirken aufgedunsen, mit stark vergrößertem Zytoplasma, ein Zeichen für den möglichen Beginn einer Nekrose. b) 55.1c: Auch diese Zellen bilden länglichere Ausläufer als gewöhnlich. Einige abgelöste, abgekugelte Zellen sind erkennbar. c) 55.1c, nochmals doppelt so stark vergrößert: In der Mitte sind zahlreiche Vakuolen zu sehen, oben eine angeschwollene Zelle.

Wie man in Zellvitalitätstests mit Alamar Blue, Neutralrot und ATP-Bestimmung gleichermaßen erkennen konnte, waren die Zellen nach 6 Wochen kontinuierlicher Sorafenib-Behandlung tatsächlich teilresistent. Eine bei den normalen Zellen stark

zytotoxische Konzentration von 20 μ M mit Absenkung der Vitalität auf ca. 40%, reduzierte die Vitalität der resistenten Zellen auf lediglich 70%.

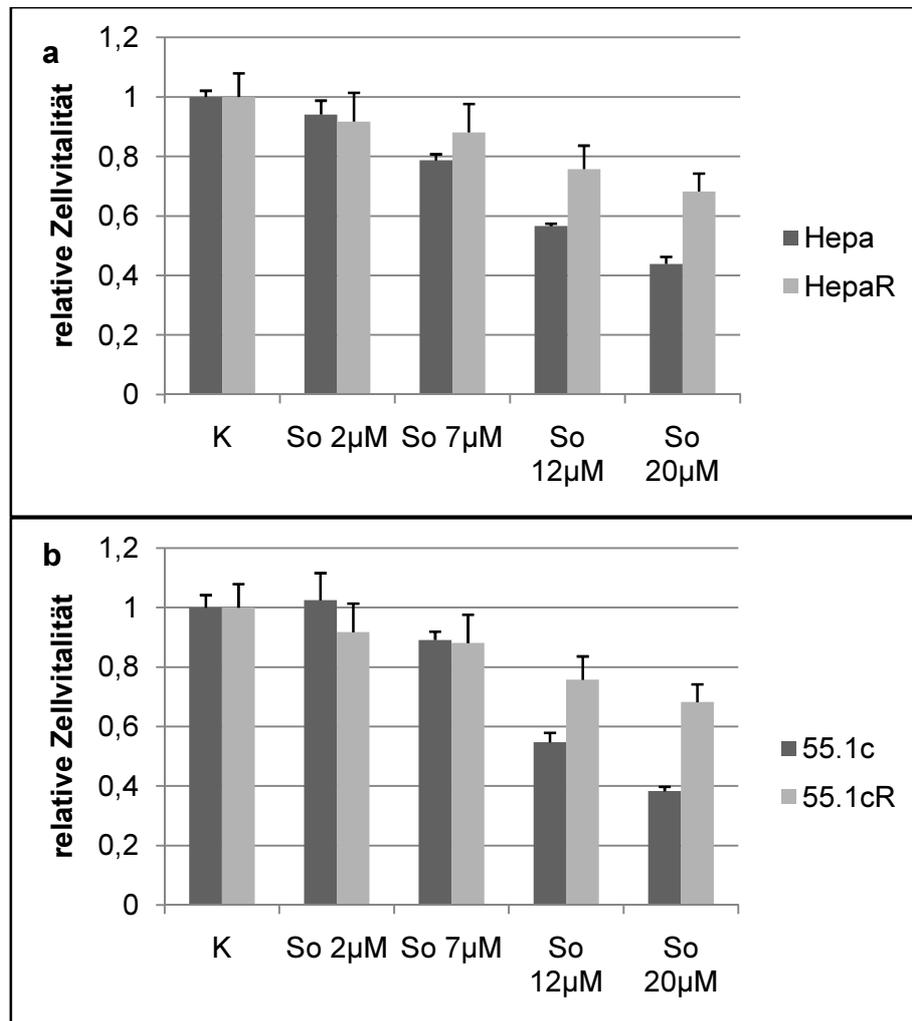


Abbildung 30: Relative Zellvitalität, ermittelt mit Alamar Blue. Versuch in 4facher Ausführung mit der Standardabweichung. a) Die Vitalität der Hepa1c1c7-resistenten Zellen (HepaR) ist bei hoher Sorafenib-Konzentration 20-30% höher als die von Hepa1c1c7. b) Die Vitalität der 55.1c-resistenten Zellen (55.1cR), ist 30% höher als die von 55.1c. Der Unterschied ist noch etwas stärker als bei HepaR.

4.4.2 Zytotoxizitätsassays mit den Sorafenib-resistenten Zellen

In vorhergehenden Zytotoxizitätstests mit den ursprünglichen Zelllinien 55.1c und Hepa1c1c7 konnte ein deutlich vitalitätsreduzierender Effekt der Doppelbehandlung mit Sorafenib und FH535/iCRT3 festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob die simultane Behandlung auch auf die Sorafenib-resistenten Zellen zytotoxisch wirkt, wurde derselbe Versuch, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, mit den neu

angezöchteten Zellen durchgeführt. Dabei wurde eine für diese Zellen nicht-zytotoxische und eine zytotoxische Sorafenib-Konzentration gewählt und jeweils mit einem Wnt-Inhibitor kombiniert.

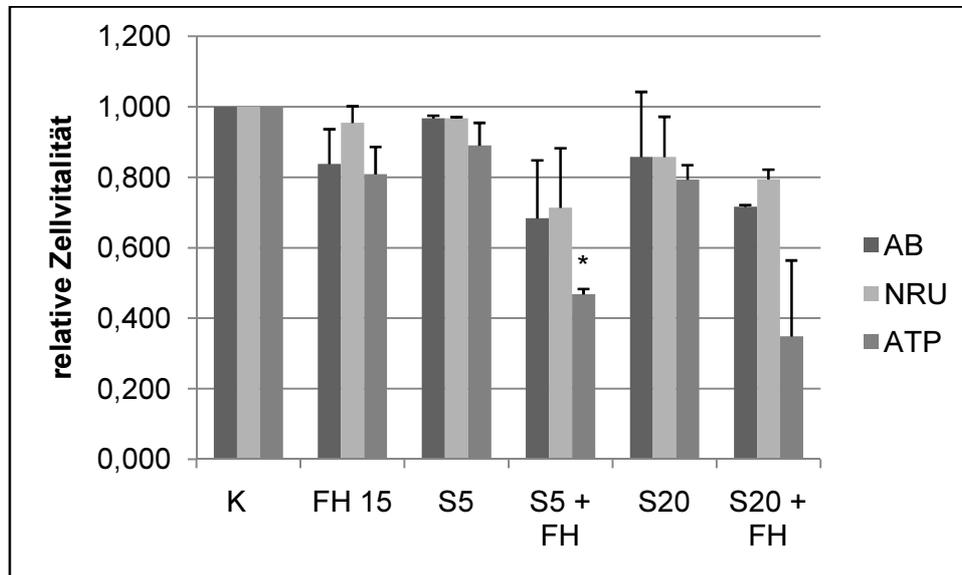


Abbildung 31: Relative Zellvitalität in 55.1cR. 4-malige Versuchswiederholung in 4fach Bestimmung. FH535 15µM (FH15), Sorafenib einmal 5µM (S5), einmal 20µM (S20). Die zusätzliche Gabe von FH535 zu Sorafenib wirkt deutlich zytotoxisch, im sensitivsten Test, der ATP-Bestimmung, mit Sorafenib 5µM + FH535 15µM sogar signifikant im Vergleich zu Sorafenib 5µM allein (*). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

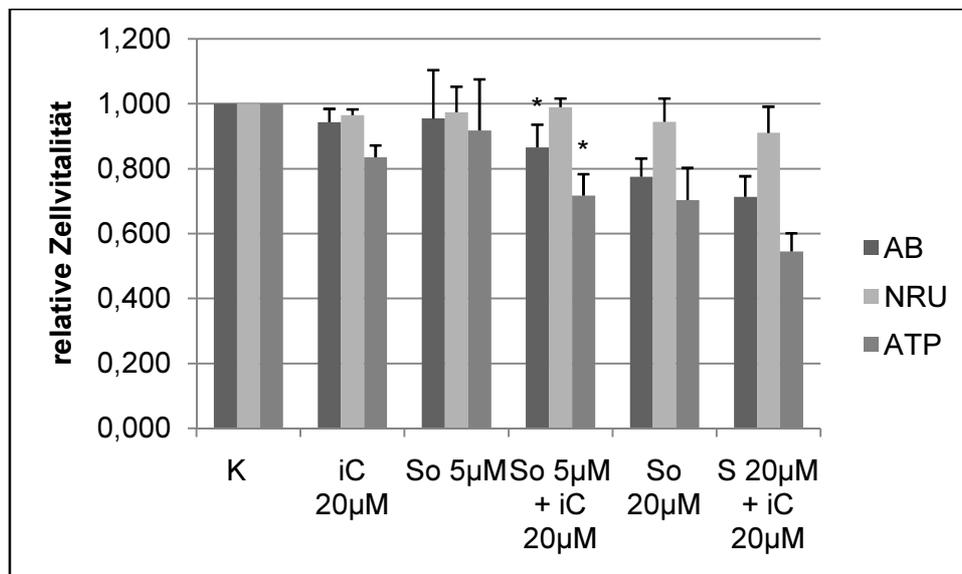


Abbildung 32: Relative Zellvitalität in Hepa1c1c7R. 4-malige Versuchswiederholung mit $n=4$. Die Gabe von iCRT3 20µM zu Sorafenib 5µM senkt die Vitalität in zwei Tests signifikant im Vergleich zu Sorafenib 5µM allein (*). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

Auch die entsprechende Einzel- und Doppelbehandlung mit iCRT3 in 55.1cR und mit FH535 in Hepa1c1c7R zeigte ein ähnliches Ergebnis.

Man sieht, dass die Simultanbehandlung auch bei den resistenten Zellen die erwünschte Wirkung erzielte. Signifikante Effekte erreichte man vor allem bei der nicht-zytotoxischen Sorafenib-Konzentration. Es erwies sich also auch bei Sorafenib-resistenten Zellen als nützlich, für eine zytotoxische Wirkung zusätzlich zu Sorafenib die Wnt-Inhibitoren einzusetzen.

4.4.3 Proliferationsassay mit den Sorafenib-resistenten Zellen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Simultanbehandlung auch bei den resistenten Zellen die Vitalität mindert, stellte sich die Frage, ob sie ebenfalls in der Lage ist, die Proliferation über einen längeren Zeitraum zu hemmen. Hierzu wurde derselbe Versuch wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, mit den Sorafenib-resistenten Zellen durchgeführt.

Bei der Zelllinie 55.1cR wurde die Proliferation vor allem durch die Doppelbehandlung Sorafenib und FH535, aber auch in Kombination mit iCRT3 deutlich gehemmt. Dies entspricht den Versuchsergebnissen mit der ursprünglichen, nicht-resistenten Zelllinie.

Bei der Linie Hepa1c1c7R verlief die Proliferationskurve ebenfalls für Sorafenib und FH535 sehr flach. Die anderen Proliferationskurven erinnerten gleichfalls an diejenigen aus dem vorhergehenden Versuch mit Hepa1c1c7, allerdings verliefen sie bei nur einmaliger Durchführung des Versuchs nicht so deutlich sigmoidal.

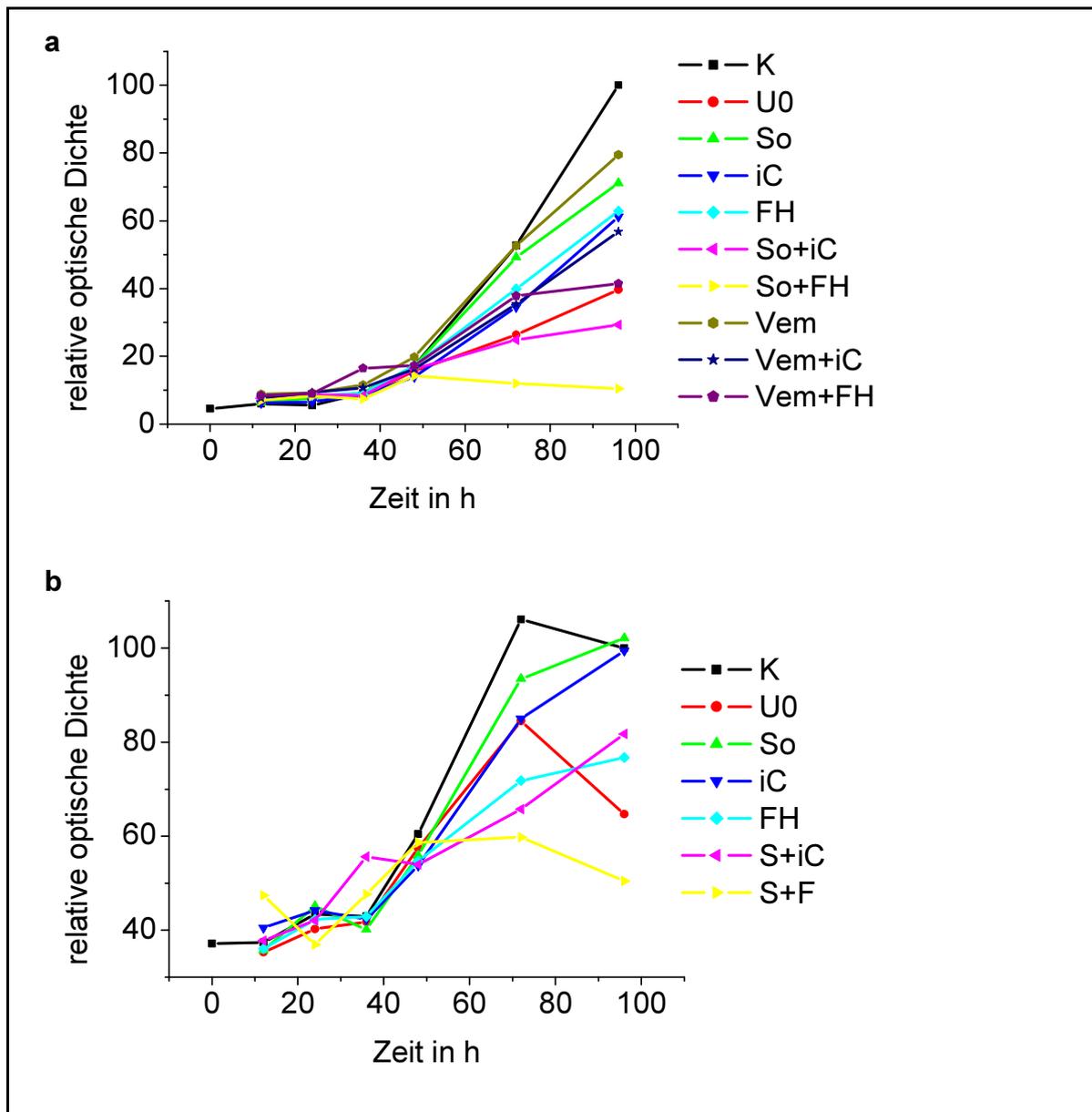


Abbildung 33: Proliferationskurven von a) 55.1cR und b) Hepa1c1c7R mit verschiedenen Behandlungen. Der Versuch wurde in 8fach-Bestimmung durchgeführt, die Standardabweichung lag zwischen 1- 11%. In 55.1cR hemmen Sorafenib + FH535, Sorafenib + iCRT3, sowie U0126 und Vemurafenib + FH535 die Proliferation am meisten. In Hepa1c1c7R scheint die Proliferation gegen Ende des Behandlungszeitraums zu sistieren bzw. abzunehmen. Am deutlichsten ist die Hemmung auch hier mit Sorafenib + FH535.

Obwohl der Versuch nur einmalig durchgeführt wurde, lässt sich hier ein eindeutiger Trend erkennen: Auch bei den Sorafenib-resistenten Zellen zeigte die Doppelbehandlung im Proliferationsassay einen stark wachstumshemmenden Effekt in beiden resistenten Zelllinien.

5 DISKUSSION

Interaktion zwischen dem Wnt- und dem MAPK-Signalweg

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde analysiert, ob und wie sich der Wnt- und der MAPK-Signalweg gegenseitig beeinflussen. Hierzu wurde mittels verschiedener Inhibitoren jeweils ein Signalweg gehemmt und nach 24h die Aktivität des anderen Weges ermittelt. Dies fand auf Transkriptions-, mRNA- und Protein-Ebene statt. Die Versuche ergaben bei den Zelllinien 70.4 und 55.1c eine signifikante Senkung des *Firefly*-Luciferase-Signals, d. h. der β -Catenin-Aktivität, durch die MAPKK-Inhibitoren Sorafenib, U0126 und Vemurafenib auf 40 bis 60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Solch eine Reduktion von β -Catenin durch Sorafenib wurde auch schon in Huh7-HCC-Zellen gezeigt [93]. Dies spricht für eine im Normalzustand positive Regulierung von β -Catenin durch die MAPKK. Solch eine positive Beeinflussung wurde schon mehrfach beschrieben: z. B. Der Wnt-Corezeptor LRP6 wird in Nieren- und Chondrosarkomzellen u.a. durch ERK1 und ERK2 phosphoryliert und somit β -Catenin aktiviert [94]. In Osteoblasten phosphorylieren ERK1 und ERK2 auch GSK3 β und inaktivieren sie somit, was zum verminderten Abbau von β -Catenin führt [63]. HGF, ein Wachstumsfaktor welcher die MAPKK aktiviert, vermindert in menschlichen Leberzellen das membranständige E-Cadherin und fördert so die Transkriptionsaktivität von β -Catenin [95]. In Kolonadenomen ist K-RAS für die β -Catenin-Translokation in den Zellkern notwendig [66]. Die Senkung des *Firefly*-Luciferase-Signals durch die MAPKK-Inhibitoren spricht für die Suppression solch einer positiven Beeinflussung, sie könnte jedoch auch über ganz andere Mechanismen wie Aktivierung oder Inhibition anderer Signalwege vermittelt werden.

Bei den Hepa1c1c7 senkte U0126 ebenfalls das *Firefly*-Luciferase-Signal, jedoch kam es durch Sorafenib zu einer Induktion. Hepa1c1c7 ist der einzige der verwendeten Zellklone, welcher H-ras-mutiert ist. Nachgewiesen ist, dass die H-ras-Mutation in Maushepatozyten zur Erhöhung der mRNA- und Proteinmengen an E-Cadherin führt, welches β -Catenin bindet [22, 96]. Die Hemmung der gesteigerten MAPKK-Aktivität, auf Membranebene und durch Raf-Inhibition, könnte demnach zur Verminderung an E-Cadherin und zur verstärkten Freisetzung und Aktivität von

β -Catenin führen. U0126 hingegen hemmt erst auf Ebene von MEK1 und MEK2, was ein Grund dafür sein könnte, dass hier die β -Catenin-Aktivität wieder gering ist. Jedoch ist es nicht festzustellen, wodurch die jeweilige Induktion und Reduktion wirklich zustande kam, es könnten ganz unbekannte Signalwegmechanismen oder auch ganz andere, zufällige Faktoren eine Rolle spielen.

Auch bei Messung der ERK-Aktivität mittels *Gaussia-AP1* ergab sich eine Signalreduzierung auf bis zu 50% durch die Wnt-Inhibitoren, welche jedoch meist nicht signifikant war. Als Grund für die hier sehr hohen Standardabweichungen kann die geringe Transfektionseffizienz für den *Gaussia-AP1*-Reporter angenommen werden. Daher sollten die Versuche mit einem anderen Reporter wie z. B. dem TSm wiederholt werden, mit welchem sich schon in einem Versuch in 3fach-Bestimmung eine eindeutigere Signalabsenkung und geringe Standardabweichung ergab. Dies spricht tendenziell für eine positive Regulierung der MAPKK durch den Wnt-Signalweg, solch eine Beeinflussung ist schon mehrfach beschrieben. Z. B. phosphoryliert in Kolonzellen GSK3 β RAS, was dessen Degradierung auslöst, Aktivierung von β -Catenin hingegen führt zu RAS-Stabilisierung [61]. Jedoch gibt es auch zahlreiche Beispiele für eine negative Beeinflussung der MAPKK durch den Wnt-Signalweg. Um eine klare Aussage über die Beeinflussung in 70.4, 55.1c und Hepa1c1c7 zu treffen, müsste der Versuch mit dem TSm-Reporter mehrfach durchgeführt werden.

Die Untersuchungen auf mRNA-Ebene bestätigten die Luciferase-Messungen größtenteils, auch wenn sie selten signifikant waren. Grund für die Unterschiede zwischen Transkriptionsaktivität und Ziel-mRNA-Quantität kann die Beeinflussung anderer Signalwege und anderer Promotoren durch die Inhibitoren sein, welche die Transkription modulieren. Außerdem sind Analysen auf mRNA-Ebene generell fehleranfälliger, z. B. schon durch leichte Verunreinigung, als Analysen mit Hilfe von Luciferasen. Bei Hepa1c1c7 zeigte sich bemerkenswerter Weise auch auf mRNA-Ebene eine deutliche Induktion durch Sorafenib.

Die Proteinanalyse ergab eine signifikante Abnahme des aktiven, nicht phosphorylierten β -Catenins auf ca. 80% durch U0126 und eine nicht-signifikante auf 90% durch Sorafenib in allen Zelllinien. Die reduzierte Menge an aktivem β -Catenin steht in Übereinstimmung mit den *Firefly*-Luciferase-Ergebnissen. Außerdem kommt

es durch alle Inhibitoren zu einer Reduktion des Proteins Icat. Es hemmt die β -Catenin-abhängige Transkription. Das Icat-codierende Gen *Ctnnbip1* ist ein Zielgen der MAPK, welches nachweislich in den periportalen Hepatozyten besonders stark transkribiert wird [68]. Dies steht in Übereinstimmung mit der verminderten Icat-Proteinmenge unter RAF- bzw. MEK-Inhibition. Die Verringerung von Icat auch unter β -Catenin-Inhibition könnte somit über eine Hemmung der MAPKK unter Hemmung des Wnt-Signalwegs, entsprechend den Luciferase- und mRNA-Ergebnissen, zustande kommen. Jedoch lässt sich die verminderte β -Catenin-Transkriptionsaktivität unter MAPKK-Inhibition nicht über Icat erklären, da Icat dann erhöht sein müsste.

Auch die CK-Menge wird durch alle Inhibitoren reduziert, signifikant durch FH535 und durch Doppelbehandlung. CK1 α oder CK1 ϵ phosphorylieren β -Catenin am Serinrest 45. Dadurch kann dann die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β stattfinden, was letztlich zur Degradation von β -Catenin führt [28]. Die Rolle der CK1 ist sehr komplex, beispielsweise ist sie unentbehrlich für den Ablauf des regulären Zellzyklus in Mausoozyten [97]. CK1 α und CK1 ϵ sind außerdem wichtig für die Zellantwort auf Wnt-Stimulation bei den ersten Schritten der β -Catenin-Aktivierung. An der zytosolischen Seite der Zellmembran haben die Casein Kinasen sowohl aktivierende, als auch inhibierende Funktion [98]. Eine Reduktion der CK, besonders unter der Doppelinhibition, bedeutet somit eine verminderte Antwort β -Catenin-aktivitätsregulierender membranständiger Proteine bei der normalen Zellantwort auf Wachstumssignale in Form von Wnts.

Auch wenn sich bei Inhibition eines Signalwegs meist eine Suppression der Aktivität des anderen Weges ergab, lässt sich keine eindeutige Aussage über eine positive oder negative gegenseitige Beeinflussung treffen. Berücksichtigt werden muss, dass die Inhibitoren zwar möglichst spezifisch sind, aber meist zusätzliche Zielstrukturen besitzen. Wie bereits von Davies et al. untersucht, sind insbesondere Inhibitoren für Proteinkinasen meist nicht spezifisch und hemmen mehrere Kinasen gleichzeitig [81]. Sorafenib beeinflusst als Multikinaseninhibitor mehrere Rezeptoren und Signalwege gleichzeitig [77]. Auch Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Proteinen sind häufig: Der MAPK-Inhibitor U0126 bindet an MEK1 und 2, aktiviert aber auch den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), welcher unter anderem die Transkription von

Cytochrom P450-Enzymen induziert [99]. Der Wnt-Inhibitor FH535 bindet außer an den β -Catenin/TCF-Komplex auch an den intranukleär gelegenen Rezeptor PPAR γ/δ , welcher im aktivierten Zustand als Transkriptionsfaktor fungiert [80]. Dies könnte erklären, warum man mit zwei verschiedenen Wnt- bzw. MAPK-Inhibitoren unterschiedliche Effekte erzielt. Es scheint also stark vom jeweiligen Inhibitor und von der Zelllinie abzuhängen, was mit dem anderen Signalweg unter Inhibition geschieht. Diese Schlussfolgerung steht in Einklang zu bisherigen Forschungsergebnissen, die je nach Zelltyp und Versuch ganz unterschiedlich ausfallen, siehe Review von Zeller et al. [43].

Doppelinhibition des Wnt- und des MAPK-Signalwegs führt zu starker Zytotoxizität

Die Untersuchung der Zellvitalität unter kombinierter Inhibition des Wnt- als auch des MAPK-Signalwegs ergab eine deutliche Reduktion der Zellvitalität auf bis zu 60% im Vergleich zur Einzelinhibition. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle fiel sie auf bis zu 50% ab. Ausschlaggebend im Hinblick auf neue therapeutische Optionen sind jedoch die Zellbehandlung und das Zellwachstumsverhalten über eine größere Zeitspanne als nur 24h. Dabei wurde die Zellproliferation durch die Doppelbehandlung über einen längeren Zeitraum stark gehemmt: Bei Behandlung mit Sorafenib und FH535 proliferieren die Zellen nur um ca. 3-15% im relativen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in 5 Tagen, am stärksten ausgeprägt ist der Effekt bei Hepa1c1c7. Aber auch bei Behandlung mit Sorafenib und iCRT3 wird nur eine Vitalität von 45% im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Aber auch FH535 alleine senkt die Proliferationsrate auf bis zu 50%.

Grund für die verstärkte Zytotoxizität der Doppel- im Vergleich zur Einzelbehandlung kann zum einen ein additiver Zytotoxizitäts-Effekt sein, den zwei allein nur leicht zytotoxische Substanzen in Kombination auf eine Zelle haben. Zum anderen kann es bei kombinierter Inhibition auch zu Veränderungen anderer Signalwege, zur Störung der Zelltodregulation und zu Störungen des Zellzyklus kommen. So könnte das Fehlen des proliferationsfördernden c-myc, welches sowohl Zielgen der β -Catenin-Transkription ist [16], als auch durch die MAPKK direkt und indirekt über die PI3K stabilisiert wird [36], eine Rolle spielen. Ein weiterer entscheidender Faktor könnten

den Zellzyklus antreibende Proteine wie Cyclin D1, Zielgen von β -Catenin [100], und die ERK-induzierte Transkription von Genen wie ELK1 und c-Fos sein. Sie fördern in unbeeinflusstem Zustand die Proliferation und Differenzierung [33], was durch die Doppelinhibition wegfallen kann.

Interessant ist, dass auch die Wnt-Inhibitoren alleine die Proliferation deutlich hemmen. Nach Yun et al. hemmt Axin ERK, MEK1, RAF1 und zudem die Proliferation in Primärhepatozyten, wenn β -Catenin nicht mutiert ist [60]. Möglich ist, dass unter Bindung des β -Catenin-TCF4-Komplexes durch FH535 mehr Axin zur Verfügung steht, da dieses durch fehlendes freies β -Catenin im Zytoplasma nicht mehr im Abbaukomplex benötigt wird. Dies würde sowohl zu den Interaktionsergebnissen mit verminderter MAPKK-Aktivität bei Wnt-Inhibition als auch zur Proliferationshemmung bei Behandlung nur mit FH535 oder iCRT3 passen. Zur Abklärung müsste in den hier verwendeten Zellen unter Wnt-Inhibition die freie Axin-Menge in Zusammenhang mit der MAPKK-Aktivität untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur möglichen Wirkung der Doppelinhibition ist, dass *Ctnnb1*(β -Catenin)-mutierte Lebertumoren der Maus ein anderes Genexpressions-Profil als *H-ras*-mutierte Tumoren aufweisen. In *Ctnnb1*-mutierten Tumoren zeigen sich Veränderungen im Aminosäure-Stoffwechsel, während in den anderen der Lipid- und Cholesteroll-Stoffwechsel verändert ist [22]. Diese Modifikationen können dem Tumor Proliferationsvorteile verschaffen. Doppelinhibition führt demnach zur Unterbindung beider für Tumorzellen vorteilhaften Metabolismus-Varianten.

Versuche der simultanen Inhibition des Wnt- und des MAPK-Signalwegs gibt es bisher nur in Kolon-CA-Zellen: Hier ist in 30-60% gleichzeitig der Wnt-Signalweg und die MAPKK mutiert. Doppelinhibition ergab in mehreren Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus eine signifikante Wachstumsinhibition und Apoptose im Vergleich zur Einzelinhibition. Von Studien mit Patienten ist man jedoch noch weit entfernt [101]. Obwohl β -Catenin in Zytoplasma und Zellkern bei 50-70% der HCC erhöht ist, gibt es auch hier bisher kein Wnt-Signalweg-hemmendes Medikament, welches im klinischen Gebrauch ist oder in klinischen Studien untersucht wird [25]. Erhöhte β -Catenin-Mengen gehen stets mit erhöhten Cyclin D1-Mengen einher, was den Zellzyklus antreibt und zu Zellteilung führt. Nur 31% dieser Karzinome sind direkt β -Catenin-mutiert - dies ist möglicherweise ein Grund warum

es bei der zielgerichteten Krebstherapie als Angriffspunkt seltener in Betracht gezogen wird. Zudem ist der Wnt-Signalweg für viele Entwicklungsprozesse im menschlichen Körper unverzichtbar. Er beeinflusst direkt die Differenzierung von Stammzellen verschiedener Organsysteme, so z. B. des hämatopoetischen Systems, des Nervensystems, der Brustdrüse und des Darms [102]. Außerdem ist β -Catenin entscheidend für den Zellzyklus, Zell-Zellkontakte und die Zell- und Gewebshomöostase [28]. Da der Wnt-Signalweg somit unentbehrlich für zahlreiche lebensnotwendige Prozesse ist, müsste ein therapeutisch einsetzbares Medikament sehr zielgerichtet sein: Es sollte nur an den Zellen des HCC mit dem aberrant aktivierten β -Catenin wirken und die Zellen mit dem physiologisch ablaufenden Wnt-Signalweg unbeeinträchtigt lassen.

Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen MAPKK und Wnt-Signalweg im HCC wurde festgestellt, dass die β -Catenin- und Cyclin D1-Menge nicht vom H-ras-Mutationsstatus oder Phosphorylierungsstatus von Akt, GSK3 β und ERK abhängt [103]. Auch andere Publikationen weisen auf ein widersprüchliches, immer unterschiedliches Zusammenspiel der zentralen Komponenten der beiden Signalwege hin, vermutlich je nach Tumormutationstyp bzw. Zelltyp. Diese fehlende direkte Beeinflussung der β -Catenin-Aktivität z. B. durch H-ras-Mutation, und die Ergebnisse dieser Arbeit, welche einen zytotoxischen Effekt unter Doppelbehandlung egal bei welchem Mutationsstatus von β -Catenin und RAS/RAF zeigen, sprechen dafür, den Wnt-Signalweg als Angriffspunkt bei jedem Lebertumor-Mutationstyp miteinzubeziehen. Zu untersuchen wäre, ob die β -Catenin-Hemmung schon im frühen Stadium der Tumorentstehung bzw. in Tumorstufen eine Weiterentwicklung verhindern kann. Denn nachgewiesen ist, dass β -Catenin und phosphorylierte, inaktive GSK3 β die Entstehung einer Leberfibrose fördern [104]. Auch in der Resistenzbildung unter Chemotherapie spielt der Wnt-Signalweg vermutlich eine bedeutende Rolle: In Cisplatin-resistenten Huh7-HCC-Zellen fand man eine erhöhte nukleäre Akkumulation von β -Catenin. Sowohl durch Sorafenib als auch durch Wnt-Signalweg-Inhibition konnte die wachstumshemmende Wirkung von Cisplatin wieder verstärkt werden [93]. Der Wnt-Signalweg ist also auch im Zusammenspiel mit klassischen Chemotherapeutika ein interessantes therapeutisches Ziel.

Um die Wirkung der Simultaninhibition auf Zellteilung und -wachstum genauer zu untersuchen, könnte man in einem folgenden Versuch einen Proliferationsassay über einen längeren Zeitraum als 5 Tage durchführen. Möglicherweise entwickeln die Zellen nach einiger Zeit wie gegen Sorafenib auch gegen die FH535- und iCRT3-Wirkung eine Resistenz.

In der Therapieentwicklung des HCCs sollten auch andere Zielstrukturen wie der insulin-like growth factor Signalweg, der HGF/c-MET Signalweg [5] sowie mTORC1, PI3K und AKT, welche in enger Verbindung zur MAPKK stehen und in Karzinomen ebenfalls eine große Rolle spielen, nicht außer Acht gelassen werden [105]. Im Versuch einer personalisierten HCC-Therapie bewirkte, nachdem Sorafenib keine Wirkung auf den *Ctnnb1*-mutierten Tumor hatte, der mTOR-Inhibitor Everolimus eine 50%ige Tumorreduktion [106]. Interessant wäre auch, bei solchen Tumoren kombinierte β -Catenin-mTOR-Inhibition zu testen.

Apoptoseinduktion unter Simultaninhibition

Anschließend stellte sich die Frage, ob die Zellen bei Doppelinhibition durch Apoptose oder einen andere Zelltod sterben. Die Caspasen-Messung konnte bei bestimmten Inhibitor-Kombinationen ein apoptotisches Zellsterben bestätigen. Caspase 9 war in 70.4 vor allem bei Sorafenib-iCRT3-, in 55.1c bei Vemurafenib-FH535-Behandlung deutlich erhöht. Caspase 9 wird über den intrinsischen Apoptoseweg, d. h. nach Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und folgender Bildung des Apoptosomenkomplexes, aktiviert [107]. Eine Erhöhung der Effektorcaspase 3 fand sich in 70.4 und 55.1c vor allem bei Behandlung mit Sorafenib und iCRT3, in Hepa1c1c7 vor allem mit Sorafenib und FH535. In 55.1c erhöhte außerdem Vemurafenib und FH535 die Caspase 3-Aktivität.

Nachgewiesen ist, dass Sorafenib konzentrationsabhängig Apoptose induziert, in Huh7-Leberzellkultur führt es in 10 μ M-Konzentration zu 40% apoptotischen Zellen [108]. In Melanomzellen mit BRAF-Mutation löst Vemurafenib die mitochondriale Apoptose aus [109]. In Kolon-CA-Zellen bewirkt Inhibition von β -Catenin und K-RAS eine massive Induktion der Apoptose, wobei es zur Reduktion der proliferationsfördernden Proteine myc und Survivin und zur Induktion des proapoptotischen Proteins bcl-2 kommt [101]. Interessant wäre eine Quantifizierung

dieser Proteine in einem experimentellen System. Untersuchungen zur Auslösung von Apoptose in der Leber gibt es bisher aber nur bei Senkung der Aktivität entweder des β -Catenin- oder des MAPK-Signalwegs. In CD90-positiven Leber-Krebsstammzellen wurde über eine miRNA durch Aktivierung von Caspase 8 die Apoptose induziert und gleichzeitig β -Catenin hinabreguliert [110], was einen engen Zusammenhang zwischen β -Catenin und Apoptose suggeriert. Auch oxidativer Stress führt in Hepatozyten zur Apoptose, dabei wird FoxO3 aktiviert. Aktives β -Catenin reduziert die apoptotische Funktion von FoxO3 [111]. In embryonalen Leberzellen führt β -Catenin-Inhibition zu verminderter Zellproliferation und Apoptose [112]. Und auch zur MAPK gibt es Untersuchungen zum Zelltod: z. B. waren in H-ras mutierten Lebertumoren der Maus Apoptosekörperchen fünf Mal seltener als in H-ras-Wildtyp-Tumoren. Aktiviertes Ras könnte also anti-apoptotische Wirkung besitzen [113].

Sowohl der Wnt- als auch der MAPK-Signalweg stehen also in engem Zusammenhang mit Apoptose, in physiologischem Zustand regulieren sie den Zellzyklus mit und umgehen bzw. verhindern somit die Apoptose. Bei Hemmung der beiden Signalwege fällt diese Apoptose-„Inhibition“ von zwei Richtungen weg. Die Kombination mit den anderen Stressfaktoren wie Hemmung von Zellzyklus, Differenzierung und Proliferation, welche die Inhibitoren bewirken, könnte für die Zellen der Auslöser sein, den intrinsischen Weg der Apoptose, zu welchem Caspase 9 und 3 gehören, zu aktivieren. Die Inhibitoren können durch die Hemmung des Wnt- und MAPK-Signalwegs aber auch zur zusätzlichen Veränderung anderer Signalwege führen. Es könnte über noch unbekanntes Interaktion z. B. der PI3K-Akt-Signalweg, welcher in engem Zusammenhang mit dem Wnt- und besonders dem MAPK-Weg steht, inhibiert werden, welcher normalerweise durch Phosphorylierung Caspase 9 und das pro-apoptotische Protein BAD hemmt [10]. Auch wenn der genaue Mechanismus schwer herauszufinden ist, lässt sich hier auf jeden Fall festhalten, dass die Doppelinhibition in mehreren Kombinationen und in verschiedenen Zelllinien imstande ist, die Apoptose auszulösen.

Überraschend sind die starken Unterschiede in der Caspasenaktivität je nach Inhibitorkombination. Am deutlichsten zeigte sich dies in 70.4: Während es bei Sorafenib-iCRT3-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zur 90-fachen Induktion der

Caspase 3-Aktivität kommt, löst Sorafenib-FH535-Behandlung fast gar keine Caspasen-Aktivierung aus. Bei den Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays und in der mikroskopischen Kontrolle kam es jedoch unter beiden Behandlungen zu einem ähnlich starken Zellsterben. Durch Sorafenib mit FH535 werden die Zellen also in eine andere Art des Zelltods geschickt. Welcher Art könnte in folgenden Experimenten untersucht werden. Die Unterschiede in den verschiedenen Zelllinien, z. B. die starke Caspase 3-Aktivierung unter Sorafenib-Behandlung in Hepa1c1c7, nicht jedoch in 55.1c, liegen vermutlich am unterschiedlichen Mutationsstatus und den verschiedenen Grund-Signalwegaktivitäten. Z. B. ist die Zelllinie 70.4 möglicherweise am empfindlichsten gegenüber antiproliferativen und Apoptose-induzierenden Signalen, da sie als einzige im *B-ras*-, *H-raf*- und *Ctnnb1*-Wildtyp vorliegt und somit eine geringe Grundaktivität der antiapoptotischen Signalwege aufweist.

Im Versuch der Detektion apoptotischer Zellen mittels Hoechst-Färbung ließen sich nach 20h Behandlung einige Zellen erkennen, die vermutlich in die Apoptose eintreten, viele Zellen waren jedoch schon abgelöst. Dieser Versuch sollte zur Bestätigung nochmals und mit kürzerer Behandlungsdauer durchgeführt werden.

Sorafenib-resistente Zellen

Sorafenib kann im klinischen Einsatz das mittlere Überleben beim fortgeschrittenen HCC um durchschnittlich 3 Monate verlängern. Einige Karzinome besitzen eine primäre Resistenz gegen das Medikament, wofür schon prädiktive Biomarker identifiziert wurden, andere entwickeln nach einiger Zeit, durch Wechsel auf kompensatorische wachstumsfördernde Signalwege, eine sekundäre Resistenz [114]. Ob auch in vitro-Maushepatozyten nach einiger Zeit eine Sorafenib-Resistenz ausbilden, wurde durch eine 3-monatige Kultivierung der Zellen in Sorafenib-haltigem Medium getestet. Tatsächlich erwies sich die Vitalität der dauerhaft behandelten Zellen 55.1cR und Hepa1c1c7R bei einem Zytotoxizitätstest mit bis zu 20µM Sorafenib als halb so empfindlich wie die der ursprünglichen Zelllinien. Das in vitro-Zellverhalten ähnelt also demjenigen in vivo. Einen ähnlichen Versuch gibt es schon mit Huh7-Zellen, in welchen 10µM Sorafenib ebenfalls einen auf die resistenten Zellen weniger zytotoxischen und apoptotischen Effekt ausübte, als auf die

ursprüngliche Zelllinie. Hier wurde eine erhöhte Aktivität des Akt-Signalwegs gefunden, und die Kombination des Akt-Inhibitors MK-2206 mit Sorafenib löste in 3-4mal so vielen Zellen die Apoptose aus, als Behandlung mit nur einem Inhibitor [108].

Die darauffolgende Frage war, ob die Wnt-MAPKK-Simultanbehandlung der vorhergehenden Versuche auch auf die resistenten Zelllinien wirkt. In den Zytotoxizitätsassays über 24h reduzierte die Sorafenib-FH535-Behandlung die Vitalität im sensitivsten Assay mit ATP auf 50%. Im Proliferationsassay hemmte wiederum die Sorafenib-FH535-Kombination sowohl in 55.1cR als auch in Hepa1c1c7R die Zellteilung nahezu vollständig. Aber auch die Sorafenib-iCRT3-Behandlung senkte die Proliferation auf ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle und auf ca. 40% im Vergleich zu Sorafenib alleine. Das bedeutet, dass der Effekt sogar etwas kräftiger ausfällt, als bei den ursprünglichen Zelllinien. Jedoch müsste der Versuch zur Bekräftigung dieser Aussage mehrfach durchgeführt werden. Um herauszufinden, ob die Resistenz mit einer erhöhten Wnt-Signalweg-Aktivität einhergeht, müssten beispielsweise die Firefly-Luciferase-Aktivität von 55.1cR mit derjenigen von 55.1c verglichen werden.

Sorafenib wird in der Klinik oral verabreicht mit einer Gesamttagesdosis von 400mg. Nach 7 Tagen ist der Steady State erreicht und Patienten erreichen Plasmakonzentrationen von 2 bis 10mg/l Sorafenib, was bei einem Molekulargewicht von 464,83g/mol einer Konzentration von 4 – 21 μ M entspricht [115]. Das heißt, die von uns verwendete Konzentration von 5 μ M liegt im klinisch relevanten, unteren therapeutischen Bereich.

Im nächsten Schritt sollte die Doppelinhibition des Wnt- und des MAPK-Signalwegs in einer menschlichen Hepatozyten-Zellkultur wiederholt werden, bevor sie in vivo durchgeführt werden kann, wo der für das HCC wichtige Faktor der Angiogenese und das Zusammenspiel der Hepatozyten mit Endothel- und Gallengangs-Zellen hinzukommt. Dabei sollte insbesondere die Kombination von Sorafenib mit dem Wnt-Inhibitor FH535 weiter verfolgt werden. Fraglich ist, ob die besonders effektive Wirkung des FH535 auch mit dessen zusätzlicher Inhibition des PPAR γ/δ zusammenhängt.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle im Überleben von mutierten Leberzellen *in vitro* spielt. Schon die Einzelinhibition von β -Catenin bewirkt eine deutliche Reduktion der Proliferation. Auch wenn die Interaktionsanalysen zwischen Wnt- und MAPK-Signalweg je nach Zelltyp und Behandlung etwas unterschiedliche Ergebnisse liefert, zeigt die Simultaninhibition in allen Zelllinien eine signifikante Minderung der Vitalität und Proliferation. Es würde somit naheliegen, den Wnt-Signalweg in die Erforschung von Sorafenib-Kombinations- und Ersatztherapien, welche sich derzeit vornehmlich auf den PI3K/Akt-Signalweg, den JAK-STAT-Signalweg, EGRF und andere Wachstumsrezeptoren konzentrieren, mit einzubeziehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Änderungen des Wnt-Signalwegs und der MAPK-Kaskade spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. 30% der HCC und 70% der Hepatoblastome sind *Ctnnb1*(β -Catenin)-mutiert [19]; die MAPKK zeigt in fast allen HCC eine erhöhte Aktivität oder Mutation [39]. In Lebertumoren der Maus ist stets nur einer der beiden Signalwege aktiviert, was für einen Antagonismus spricht [22]. Ein klinisch verwendetes Medikament existiert bisher nur gegen die MAPKK: Sorafenib hat das mittlere Überleben in fortgeschrittenen HCC um 3 Monate verlängert [5]. Tumoren zeigen jedoch nach längerer Therapie oft Resistenzen [77]. In dieser Arbeit sollte die Interaktion der Signalwege, die Wirkung der Simultaninhibition beider Signalwege auf Vitalität und Proliferation, als auch die Resistenzbildung gegen Sorafenib in mutierten Maushepatozyten *in vitro* untersucht werden.

In Reportergen-, PCR- und Proteinmengen-Analysen zeigten 5 verschiedene Inhibitoren in 3 Zelllinien ein unterschiedliches Zusammenspiel der Signalwege. Meist kam es zu einer Reduktion der MAPKK-Aktivität bei β -Catenin-Inhibition und umgekehrt. Sorafenib veränderte die β -Catenin-Aktivität in 2 der 3 Zelllinien. Die Simultaninhibition bewirkte eine signifikante Reduktion der Zellvitalität um 40% im Vergleich zur Einzelinhibition in allen Zelllinien. Im Proliferationsassay über 5 Tage zeigte Sorafenib allein eine Reduktion der Zellproliferation auf 70%. Die Kombinationsbehandlung Sorafenib mit dem β -Catenin-Inhibitor FH535 brachte eine Reduktion auf 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Caspasen-Messungen lieferten Hinweise, dass die Zellen dabei apoptotisch zugrunde gehen. Bei kontinuierlicher Sorafenib-Behandlung über mehrere Monate waren 2 Zelllinien nur noch halb so sensibel gegenüber den ursprünglich zytotoxischen Sorafenib-Konzentrationen. Unter Doppelbehandlung konnte auch bei diesen Zellen eine starke Reduktion von Vitalität und Proliferation gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass β -Catenin eine wichtige Rolle im Überleben von mutierten Maushepatozyten *in vitro* spielt. Die Inhibition des Wnt-zusätzlich zum MAPK-Signalweg bewirkt eine deutliche Reduktion des Zellüberlebens und der Proliferation und könnte somit ein neuer Ansatz in der Therapie des HCC sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
2. http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_leberkrebs_definition, h., 02.08.2013
3. Aravalli, R.N., C.J. Steer, and E.N. Cressman, *Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 2047-63.
4. Yoon, S.K., *The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma*. Gut Liver, 2012. **6**(1): p. 29-40.
5. Whittaker, S., R. Marais, and A.X. Zhu, *The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2010. **29**(36): p. 4989-5005.
6. Cox, R., *The multi-step nature of carcinogenesis and the implications for risk analysis*. Int J Radiat Biol, 1998. **73**(4): p. 373-6.
7. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
8. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
9. Ricci-Vitiani, L., et al., *Colon cancer stem cells*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(11): p. 1097-104.
10. Kumar, M., X. Zhao, and X.W. Wang, *Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine?* Cell Biosci, 2011. **1**(1): p. 5.
11. Morris, D.W., et al., *Insertion mutation of the int-1 and int-2 loci by mouse mammary tumor virus in premalignant and malignant neoplasms from the GR mouse strain*. J Virol, 1990. **64**(4): p. 1794-802.
12. Miller, J.R., *The Wnts*. Genome Biol, 2002. **3**(1): p. REVIEWS3001.
13. Kuhl, M., et al., *The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends Genet, 2000. **16**(7): p. 279-83.
14. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
15. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
16. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.

17. Crawford, H.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors*. *Oncogene*, 1999. **18**(18): p. 2883-91.
18. Kolligs, F.T., et al., *ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation*. *Cancer Cell*, 2002. **1**(2): p. 145-55.
19. Buendia, M.A., *Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects*. *Med Pediatr Oncol*, 2002. **39**(5): p. 530-5.
20. de La Coste, A., et al., *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8847-51.
21. Miyoshi, Y., et al., *Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3*. *Cancer Res*, 1998. **58**(12): p. 2524-7.
22. Stahl, S., et al., *Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man*. *Hepatology*, 2005. **42**(2): p. 353-61.
23. Giles, R.H., J.H. van Es, and H. Clevers, *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1653**(1): p. 1-24.
24. Taniguchi, K., et al., *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. *Oncogene*, 2002. **21**(31): p. 4863-71.
25. Wong, C.M., S.T. Fan, and I.O. Ng, *beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance*. *Cancer*, 2001. **92**(1): p. 136-45.
26. Gayet, J., et al., *Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines*. *Oncogene*, 2001. **20**(36): p. 5025-32.
27. Sinnberg, T., et al., *Suppression of casein kinase 1alpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(17): p. 6999-7009.
28. Lustig, B. and J. Behrens, *The Wnt signaling pathway and its role in tumor development*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003. **129**(4): p. 199-221.
29. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
30. Santarpia, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, *Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy*, in *Expert Opin Ther Targets*. 2012. p. 103-19.
31. Diez, D., F. Sanchez-Jimenez, and J.A. Ranea, *Evolutionary expansion of the Ras switch regulatory module in eukaryotes*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(13): p. 5526-37.

32. Sacks, D.B., *The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 833-6.
33. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
34. Anderson, M.W., et al., *Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1992. **98**: p. 13-24.
35. Binetruy, B., T. Smeal, and M. Karin, *Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain*. Nature, 1991. **351**(6322): p. 122-7.
36. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
37. Scharovsky, O.G., et al., *Inhibition of ras oncogene: a novel approach to antineoplastic therapy*. J Biomed Sci, 2000. **7**(4): p. 292-8.
38. Brose, M.S., et al., *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6997-7000.
39. Hwang, Y.H., et al., *Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2004. **29**(2): p. 113-121.
40. Gollob, J.A., et al., *Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway*. Semin Oncol, 2006. **33**(4): p. 392-406.
41. Ito, Y., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1998. **27**(4): p. 951-8.
42. Schmitz, K.J., et al., *Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 83-90.
43. Zeller, E., et al., *Mechanisms of RAS/beta-catenin interactions*. Arch Toxicol, 2013. **87**(4): p. 611-32.
44. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
45. Sansom, O.J., et al., *Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14122-7.
46. Harada, N., et al., *Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations*. Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 48-54.
47. Damsky, W.E., et al., *beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas*. Cancer Cell, 2011. **20**(6): p. 741-54.

48. Morris, J.P.t., et al., *Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(2): p. 508-20.
49. Aydinlik, H., et al., *Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors*. Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7812-6.
50. Torre, C., et al., *The transforming growth factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation*. J Hepatol, 2011. **55**(1): p. 86-95.
51. Hwang, K.A., et al., *Adenosine stimulates growth of dermal papilla and lengthens the anagen phase by increasing the cysteine level via fibroblast growth factors 2 and 7 in an organ culture of mouse vibrissae hair follicles*. Int J Mol Med, 2012. **29**(2): p. 195-201.
52. Musgrove, E.A., *Wnt signalling via the epidermal growth factor receptor: a role in breast cancer?* Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. 65-8.
53. Yun, M.S., et al., *Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 313-22.
54. Tan, X., et al., *Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 285-302.
55. Zeller, E., et al., *Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/beta-catenin pathway and candidate mediators of beta-catenin/Ras signaling interactions*. Biol Chem, 2012. **393**(10): p. 1183-91.
56. Lee, C.H., et al., *Epidermal growth factor receptor regulates beta-catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 64.
57. Roura, S., et al., *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36734-40.
58. Crampton, S.P., et al., *Integration of the beta-catenin-dependent Wnt pathway with integrin signaling through the adaptor molecule Grb2*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7841.
59. Park, K.S., et al., *APC inhibits ERK pathway activation and cellular proliferation induced by RAS*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 5): p. 819-27.
60. Jeon, S.H., et al., *Axin inhibits extracellular signal-regulated kinase pathway by Ras degradation via beta-catenin*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14482-92.
61. Jeong, W.J., et al., *Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis*. Sci Signal, 2012. **5**(219): p. ra30.

62. Holnthoner, W., et al., *Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45847-53.
63. Almeida, M., et al., *Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41342-51.
64. Cross, D.A., et al., *The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf*. Biochem J, 1994. **303 (Pt 1)**: p. 21-6.
65. Wang, Q., Y. Zhou, and B.M. Evers, *Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells*. Neoplasia, 2006. **8**(9): p. 781-7.
66. Phelps, R.A., et al., *A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss*. Cell, 2009. **137**(4): p. 623-34.
67. Zeng, G., et al., *Tyrosine residues 654 and 670 in beta-catenin are crucial in regulation of Met-beta-catenin interactions*. Exp Cell Res, 2006. **312**(18): p. 3620-30.
68. Braeuning, A., et al., *Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes*. FEBS J, 2006. **273**(22): p. 5051-61.
69. Li, Q., et al., *Cloning of the rat beta-catenin gene (Ctnnb1) promoter and its functional analysis compared with the Catnb and CTNNB1 promoters*. Genomics, 2004. **83**(2): p. 231-42.
70. Bottomly, D., et al., *Identification of {beta}-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(17): p. 5735-45.
71. Wang, I.C., et al., *Foxm1 mediates cross talk between Kras/mitogen-activated protein kinase and canonical Wnt pathways during development of respiratory epithelium*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(19): p. 3838-50.
72. <http://www.aerztekammer-hamburg.de/funktionen/aebonline/pdfs/1148039829.pdf>, 10.08.2012
73. Loeppen, S., et al., *A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors*. Carcinogenesis, 2005. **26**(1): p. 239-48.
74. Minemura, M., H. Tanimura, and E. Tabor, *Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines*. Int J Oncol, 1999. **15**(3): p. 559-63.

75. Abou-Alfa, G.K., et al., *Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial*. JAMA, 2010. **304**(19): p. 2154-60.
76. Yau, T., et al., *Phase 2 open-label study of single-agent sorafenib in treating advanced hepatocellular carcinoma in a hepatitis B-endemic Asian population: presence of lung metastasis predicts poor response*. Cancer, 2009. **115**(2): p. 428-36.
77. Xie, B., D.H. Wang, and S.J. Spechler, *Sorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(5): p. 1122-9.
78. Gonsalves, F.C., et al., *An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(15): p. 5954-63.
79. Polk, W.W., *FH535 potentiation of cigarette smoke condensate cytotoxicity is associated with changes in beta-catenin and EGR-1 signaling*. Int J Toxicol, 2012. **31**(4): p. 380-9.
80. Handeli, S. and J.A. Simon, *A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(3): p. 521-9.
81. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
82. Nikolaou, V.A., et al., *Melanoma: new insights and new therapies*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 854-63.
83. Adnane, L., et al., *Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature*. Methods Enzymol, 2006. **407**: p. 597-612.
84. Eisen, T., et al., *Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis*. Br J Cancer, 2006. **95**(5): p. 581-6.
85. Wilhelm, S.M., et al., *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): p. 3129-40.
86. Rahmani, M., et al., *Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35217-27.
87. http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2009-1/Hep1_09_FoBiSorafenib.pdf, 20.08.2012
88. Kress, S., et al., *p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors*. Mol Carcinog, 1992. **6**(2): p. 148-58.

89. Ring, L., et al., *Reporter gene HEK 293 cells and WNT/Frizzled fusion proteins as tools to study WNT signaling pathways*. Biol Chem, 2011. **392**(11): p. 1011-20.
90. <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%20Glo%20Luminescent%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf>, 02.03.2012
91. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
92. Luckert, K., et al., *A dual array-based approach to assess the abundance and posttranslational modification state of signaling proteins*. Sci Signal, 2012. **5**(206): p. p11.
93. Wei, Y., et al., *Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cell to cisplatin via suppression of Wnt/beta-catenin signaling*. Mol Cell Biochem, 2013. **381**(1-2): p. 139-44.
94. Cervenka, I., et al., *Mitogen-activated protein kinases promote WNT/beta-catenin signaling via phosphorylation of LRP6*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(1): p. 179-89.
95. Pan, F.Y., et al., *Beta-catenin signaling involves HGF-enhanced HepG2 scattering through activating MMP-7 transcription*. Histochem Cell Biol, 2010. **134**(3): p. 285-95.
96. Hailfinger, S., et al., *Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors*. Hepatology, 2006. **43**(3): p. 407-14.
97. Gross, S.D., et al., *A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 24): p. 3083-90.
98. Del Valle-Perez, B., et al., *Coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(14): p. 2877-88.
99. Andrieux, L., et al., *Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(4): p. 934-43.
100. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
101. Mologni, L., et al., *Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51449.
102. Ring, A., Y.M. Kim, and M. Kahn, *Wnt/Catenin signaling in adult stem cell physiology and disease*. Stem Cell Rev, 2014. **10**(4): p. 512-25.
103. Gotoh, J., et al., *Cyclin D1 over-expression correlates with beta-catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3*

- beta and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(3): p. 435-42.
104. Zhai, X., et al., *The beta-catenin pathway contributes to the effects of leptin on SREBP-1c expression in rat hepatic stellate cells and liver fibrosis*. *Br J Pharmacol*, 2013. **169**(1): p. 197-212.
 105. Galoian, K., H.T. Temple, and A. Galoyan, *mTORC1 inhibition and ECM-cell adhesion-independent drug resistance via PI3K-AKT and PI3K-RAS-MAPK feedback loops*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(3): p. 885-90.
 106. Bhoori, S., et al., *Personalized molecular targeted therapy in advanced, recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: a proof of principle*. *J Hepatol*, 2010. **52**(5): p. 771-5.
 107. <http://de.wikipedia.org/wiki/Apoptose>., 25.04.2012
 108. Chen, K.F., et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **337**(1): p. 155-61.
 109. Beck, D., et al., *Vemurafenib Potently Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in BRAFV600E Melanoma Cells*. *Science Signaling*, 2013. **6**(260).
 110. Fang, L., et al., *miR-548c-5p inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis in CD90(+) HepG2 cells*. *Radiol Oncol*, 2012. **46**(3): p. 233-41.
 111. Tao, G.Z., et al., *Wnt/beta-catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(24): p. 17214-24.
 112. Monga, S.P., et al., *Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(1): p. 202-16.
 113. Frey, S., et al., *Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha-ras oncogene*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(2): p. 161-6.
 114. Zhai, B. and X.Y. Sun, *Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma*. *World J Hepatol*, 2013. **5**(7): p. 345-52.
 115. Awada, A., et al., *Phase I safety and pharmacokinetics of BAY 43-9006 administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumours*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(10): p. 1855-61.

8 ANHANG

8.1 Tabellen und Diagramme

Tabelle 41: Konzentration Wnt-Signalweg-Inhibitoren in 70.4

Wnt- Signalweg- Inhibitoren	STF-Signal-Senkung	Zytotoxizität
FH 535	15µM (auf 20%)	70µM
iCRT3	20µM (auf 65%)	140µM

Tabelle 42: Konzentration MAPKK-Inhibitoren in 70.4

MAPKK-Inhibitoren	Gaussia-AP1-Signal- Senkung	Zytotoxizität
Sorafenib	5µM (auf 30%)	9µM
U 0126	20µM (auf 50%)	170µM

Tabelle 43: Konzentration Wnt-Signalweg-Inhibitoren in Hepa1c1c7

Wnt- Signalweg- Inhibitoren	STF-Signal-Senkung	Zytotoxizität
FH 535	15µM (auf 45%)	150µM
iCRT3	20µM (auf 10%)	130µM

Tabelle 44: Konzentration MAPKK-Inhibitoren in Hepa1c1c7

MAPKK-Inhibitoren	Gaussia-AP1-Signal- Senkung	Zytotoxizität
Sorafenib	5µM (auf 55%)	7µM
U 0126	20µM (auf 40%)	100µM

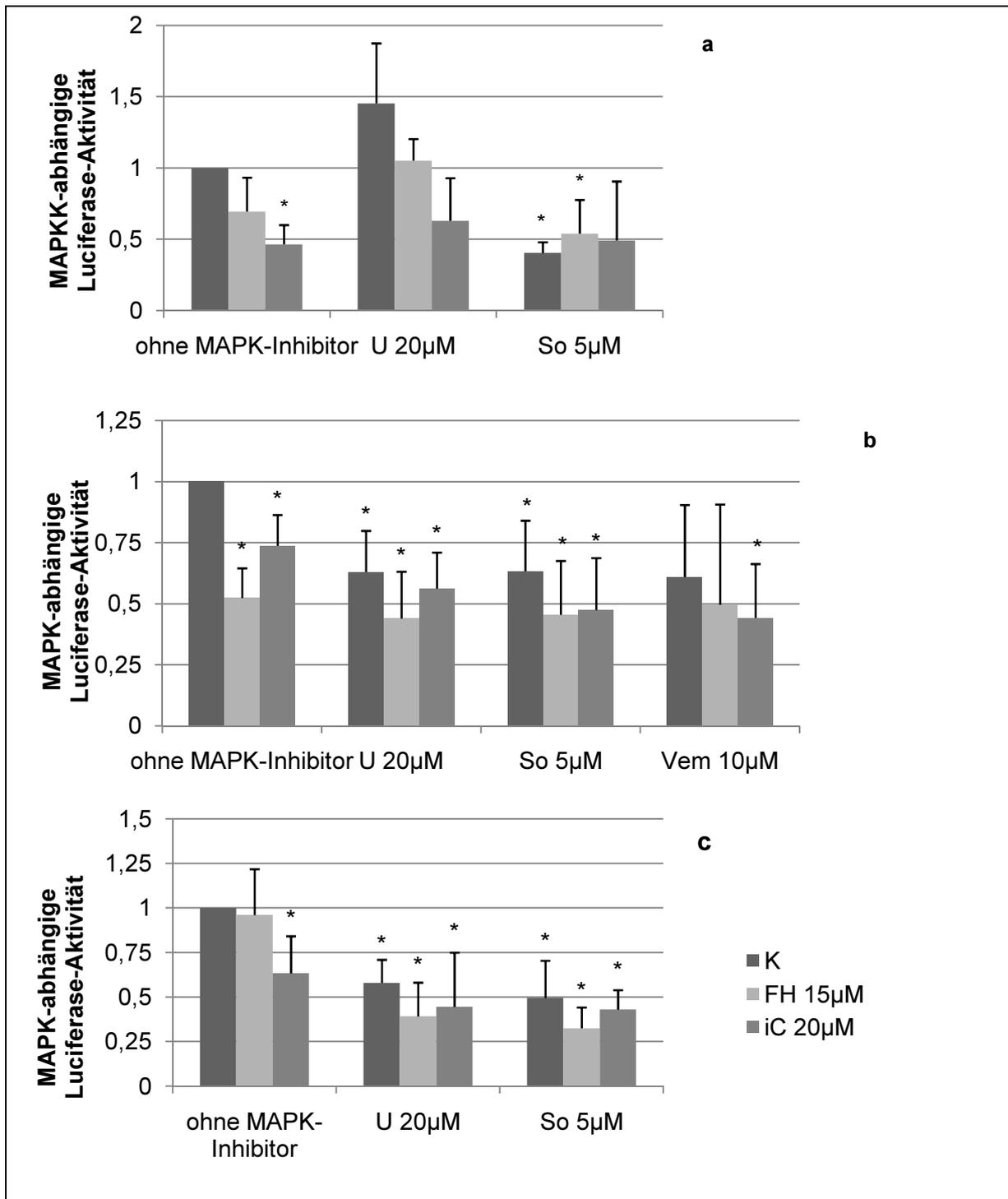


Abbildung 34: Relative *Gaussia-AP1*-Luciferase-Aktivität, normiert auf Alamar Blue in (a) 70.4STFK15, (b) 55.1cSTFK53 und (c) Hepa1c1c7 nach Behandlung im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (K). Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=5 Versuchen mit der Standardabweichung $p \leq 0,05$ (*Student's T-Test*). Signifikante Signalminderung (*) im Vergleich zur Kontrolle (K). In (a) signifikante Signalsenkung durch den Wnt-Inhibitor iCRT3 (iC), durch den MAPKK-Inhibitor Sorafenib (So) weitere Signalsenkung, mit U0126 (U) uneindeutig. In (b) signifikante Signalsenkung durch FH535 (FH) und iCRT3, keine wesentlich deutlichere Absenkung mit den MAPKK-Inhibitoren. Jedoch mit hohen Standardabweichungen. In (c) Signalminderung durch iCRT3, tendenziell verstärkt durch U0126 und Sorafenib.

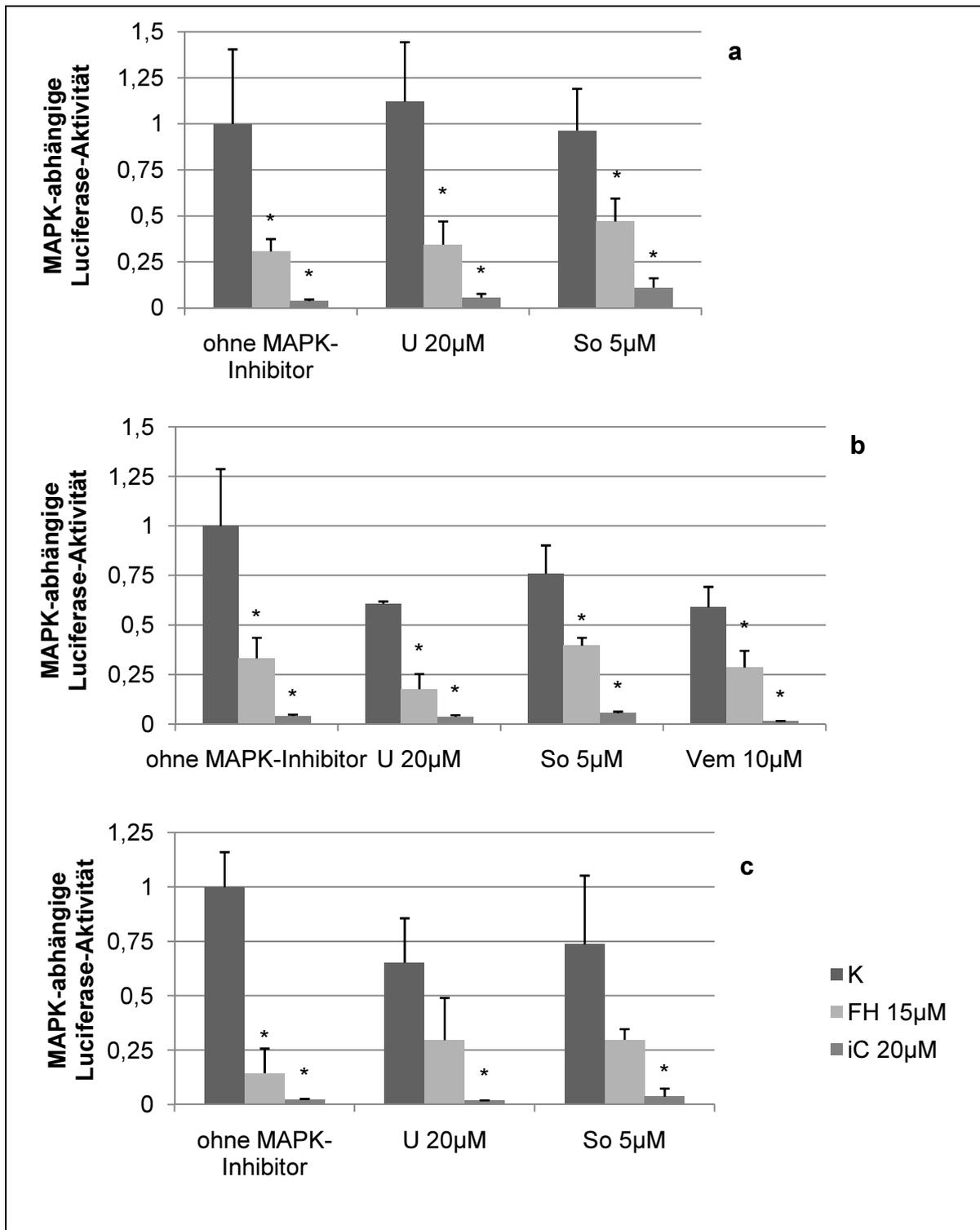


Abbildung 35: Relative TSm-Luciferase-Aktivität, normiert auf Alamar Blue in (a) 70.4, (b) 55.1c und c) Hepa1c1c7 nach Behandlung im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (K). Gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Versuch in 3-facher Ausführung mit der Standardabweichung $p \leq 0,05$ (Student's T-Test). Signifikante Signalminderingung (*) im Vergleich zur Kontrolle (K). In (a) und (b) stets signifikante Signalenkung durch die Wnt-Inhibitoren FH535 (FH) und besonders iCRT3 (iC). In (c) signifikante Signalminderingung durch FH535 und iCRT3 ohne MAPK-Inhibitor, außerdem signifikant mit U0126 (U) + iCRT3 und mit Sorafenib (So) + iCRT3. Zusammenfassend mit FH535 meist eine Signalminderingung auf ca. 30%, mit iCRT3 auf unter 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Somit halb so starke MAPKK-Aktivität unter Doppelbehandlung im Vergleich zu den in Abb. 34 gezeigten Messungen mit der *Gaussia-AP1*-Luciferase.

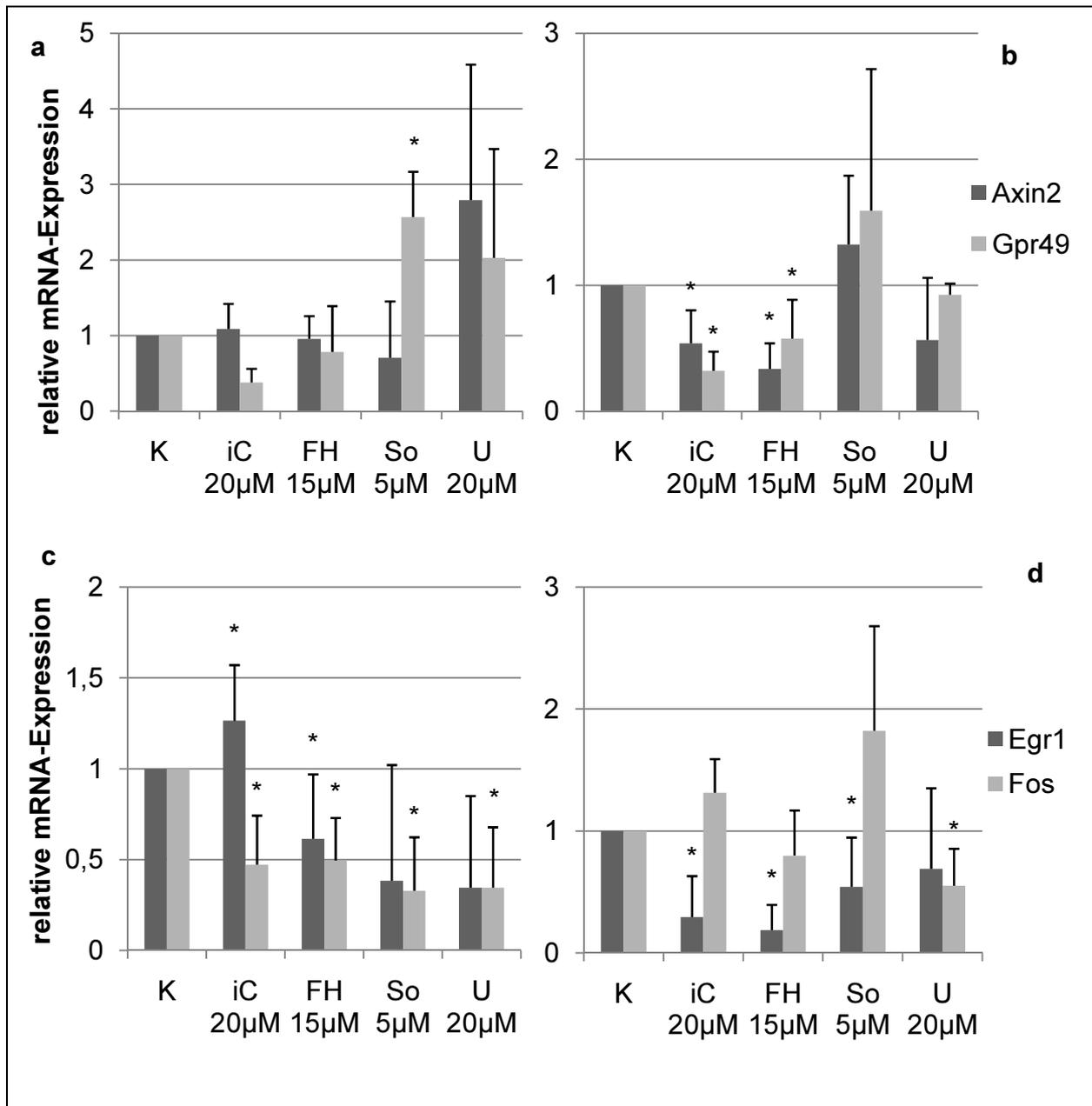


Abbildung 36: Relative mRNA-Expression der β -Catenin-Zielgene Axin2 und Gpr49 in a und b und der MAPKK-Zielgene Egr1 und Fos in c und d. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen mit den Standardabweichungen in den Zelllinien 70.4 (a, c) und Hepa1c1c7 (b, d). Durch die Wnt-Inhibitoren iCRT3 und FH535 werden die β -Catenin-abhangigen Gene Axin2 und Gpr49 herunterreguliert, die MAPKK-Inhibitoren bewirken eher eine Induktion, jedoch mit hoher Standardabweichung. Die Ziel-mRNA der MAPKK, Egr1 und Fos, wird durch alle Inhibitoren vor allem in 70.4 (c) signifikant herunterreguliert, in Hepa1c1c7 (d) sind die Ergebnisse weniger klar. *Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle. $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

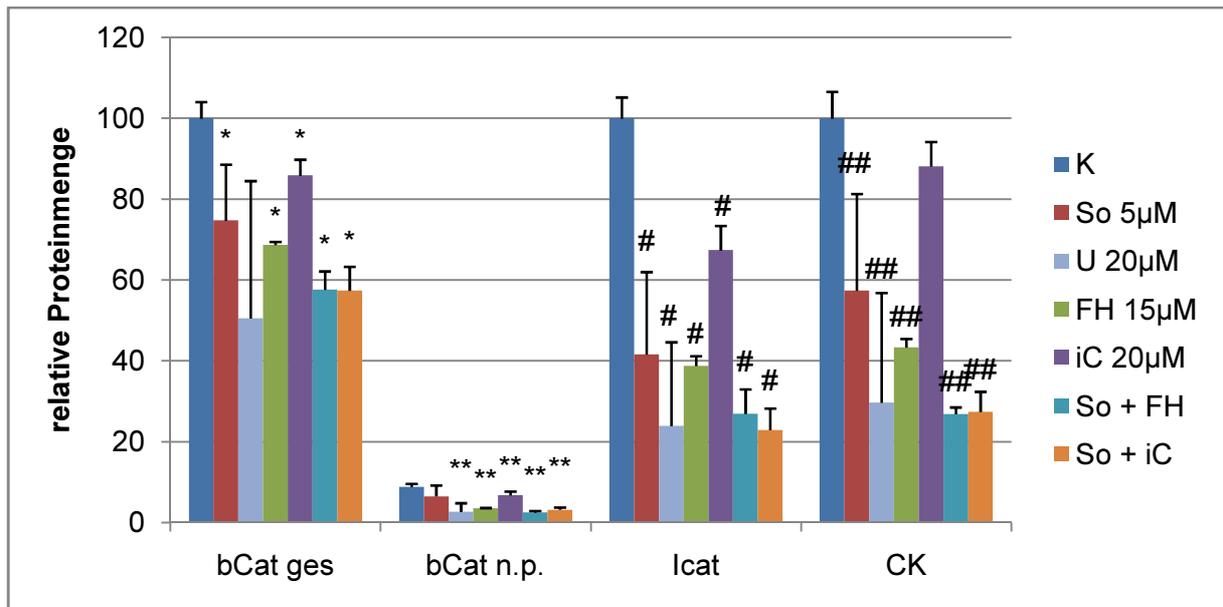


Abbildung 37: Darstellung der Proteinmengen in 55.1c. Dargestellt sind Mengen an gesamtem β -Catenin (bCat ges), nicht-phosphoryliertem β -Catenin (bCat n.p.), beide relativ bezogen auf die Menge des unbehandelten gesamten β -Catenins; das Protein Icat und Casein Kinase (CK). (*) Signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle von bCat ges, (**) signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle von bCat n.p., signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle von Icat (#), signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle der CK (##). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test). Versuch in 3fach-Bestimmung.

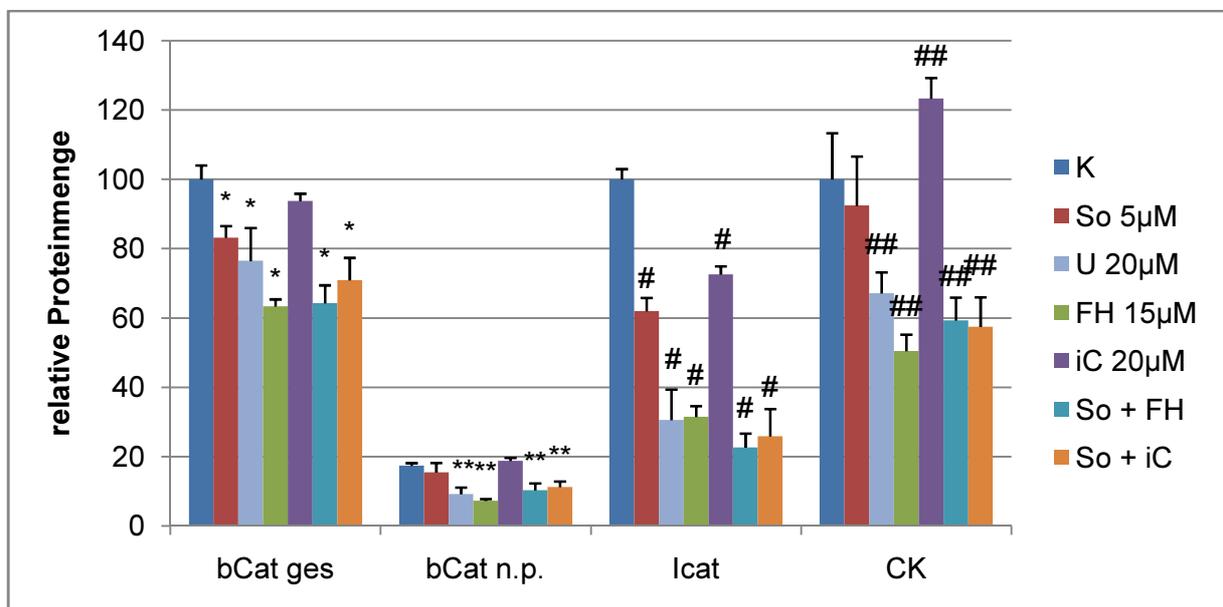


Abbildung 38: Darstellung der vorhandenen Proteinmengen in Hep1c1c7. Dargestellt sind Mengen an gesamtem β -Catenin (bCat ges), nicht-phosphoryliertem β -Catenin (bCat n.p.), beide relativ bezogen auf die Menge des unbehandelten gesamten β -Catenins; das Protein Icat und Casein Kinase (CK). (*) Signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle von bCat ges, (**) signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle von bCat n.p., signifikante Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von Icat (#), signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle der CK (##). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test). Versuch in 3fach-Bestimmung.

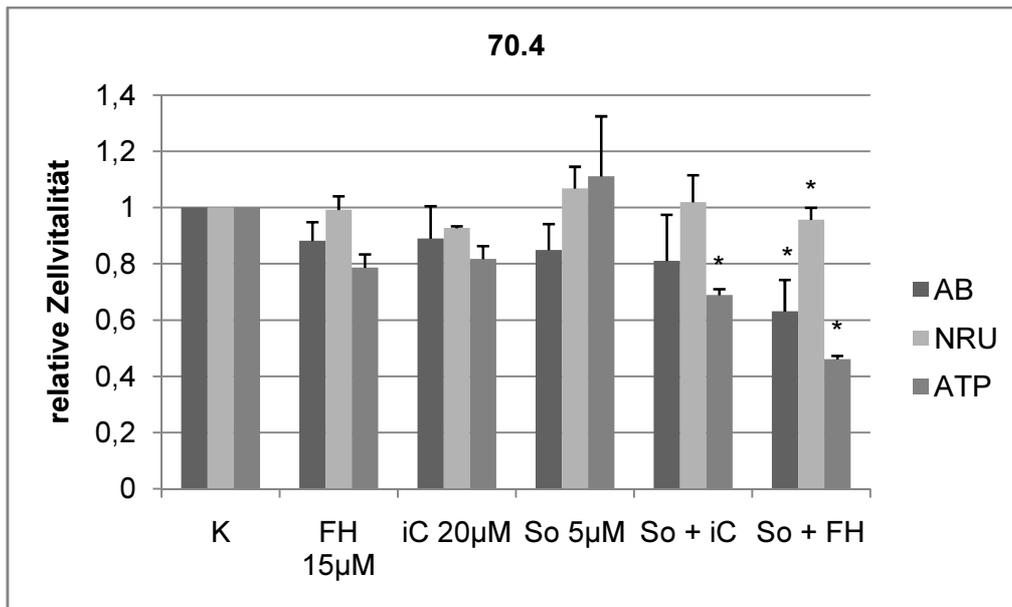


Abbildung 39: Relative Zellvitalität, Zelllinie 70.4. Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Versuchen. Ermittelt mit Alamar Blue (AB), Neutralrot (NRU) und ATP-Assay (ATP). Die Kombinationsbehandlung Sorafenib 5µM + iCRT3 20µM senkt die Vitalität deutlich, teilweise signifikant (*) im Vergleich zu Sorafenib 5µM. Sorafenib 5µM + FH535 15µM senkt die Vitalität in allen drei Tests signifikant im Vergleich zu Sorafenib 5µM. $p \leq 0,05$ (*Student's T-Test*).

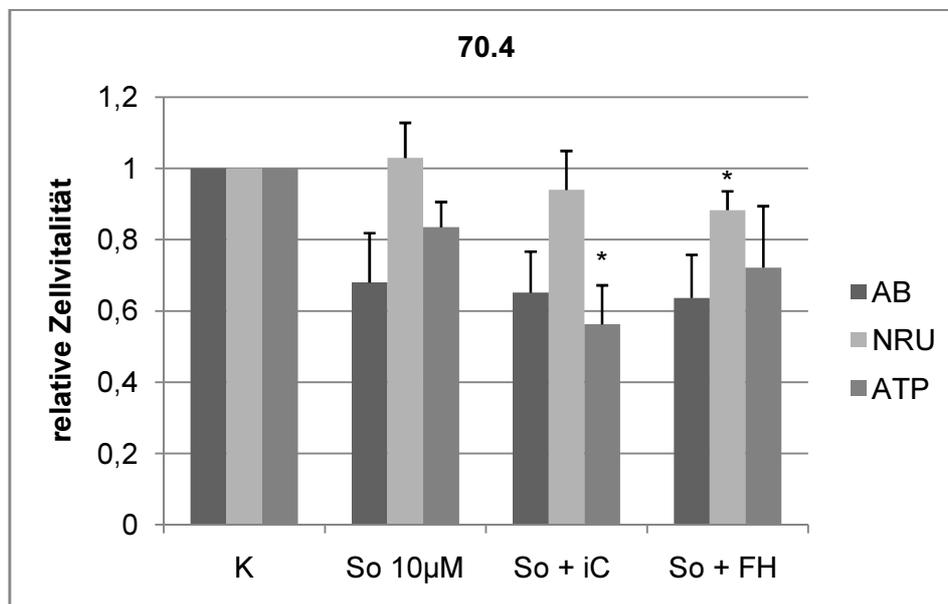


Abbildung 40: Relative Zellvitalität, 70.4. Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Versuchen. Mit 10µM Sorafenib + 20µM iCRT3 bzw. 15µM FH535 weiteres Absinken der Zellvitalität im Vergleich zu Sorafenib 10µM allein. Signifikanz im Vergleich zu Sorafenib 10µM (*), $p \leq 0,05$ (*Student's T-Test*).

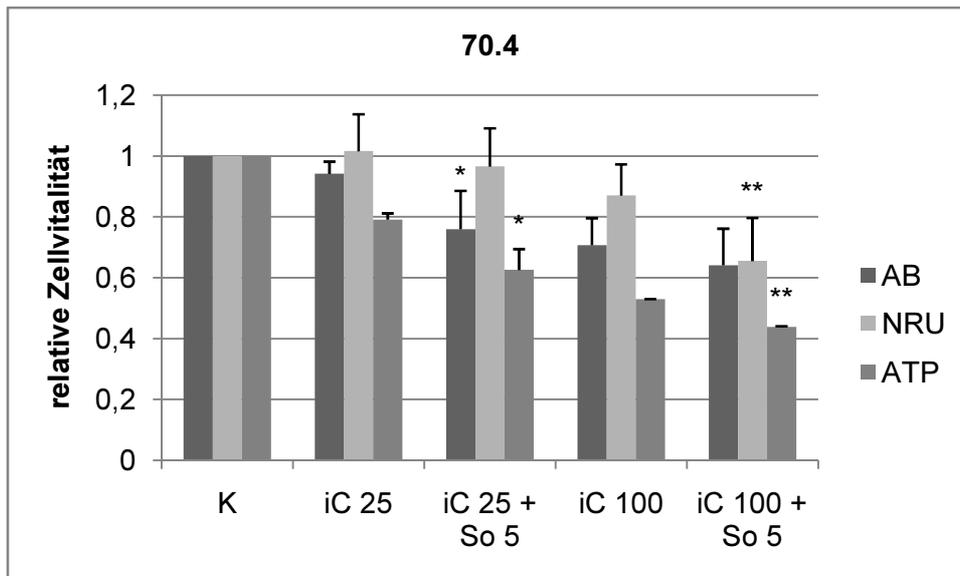


Abbildung 41: Relative Zellvitalität, 70.4. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Versuchen. Sowohl bei iCRT3 25 μ M (iC 25) als auch 100 μ M (iC100) reduziert die Zugabe von Sorafenib (So 5) die Vitalität meist signifikant. Signifikanz im Vergleich zu iC 25 μ M (*), Signifikanz im Vergleich zu iC 100 μ M (**). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

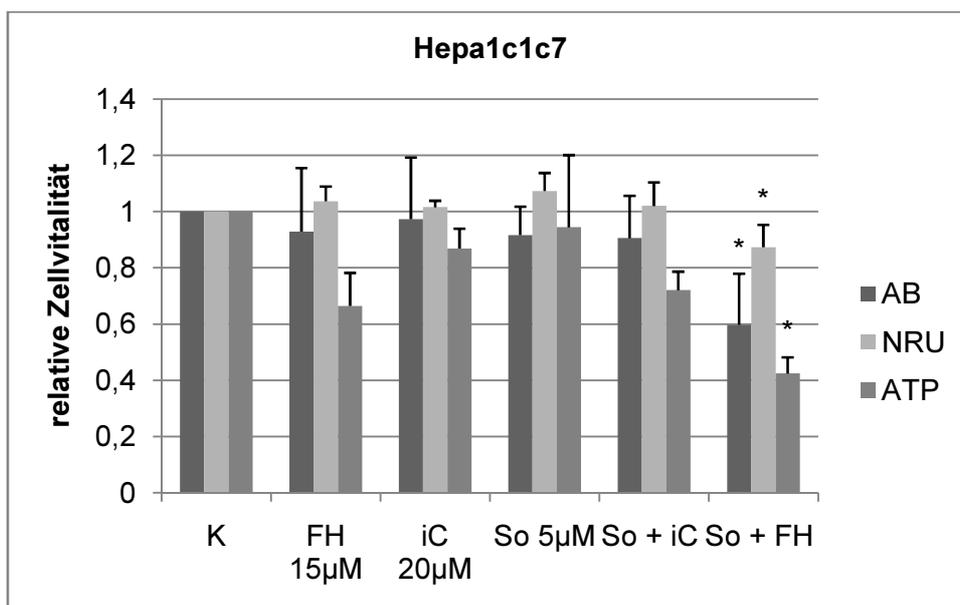


Abbildung 42: Relative Zellvitalität, Zelllinie Hepa1c1c7. Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Versuchen. Ermittelt mit Alamar Blue (AB), Neutralrot (NRU) und ATP-Assay (ATP). Die Kombinationsbehandlung Sorafenib 5 μ M + iCRT3 20 μ M senkt die Vitalität leicht. Sorafenib 5 μ M + FH535 15 μ M senkt die Vitalität in allen drei Tests signifikant (*) im Vergleich zu Sorafenib 5 μ M. $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

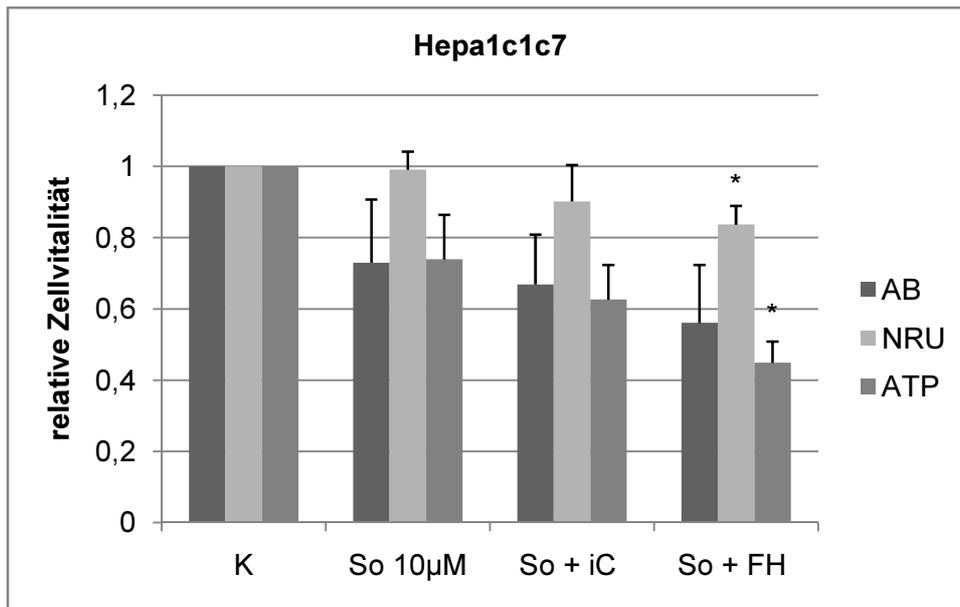


Abbildung 43: Relative Zellvitalität, Hepa1c1c7. Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Versuchen. Mit 10µM Sorafenib + 20µM iCRT3 bzw. 15µM FH535 weiteres Absinken der Zellvitalität im Vergleich zu Sorafenib 10µM allein. Signifikanz im Vergleich zu Sorafenib 10µM (*), $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

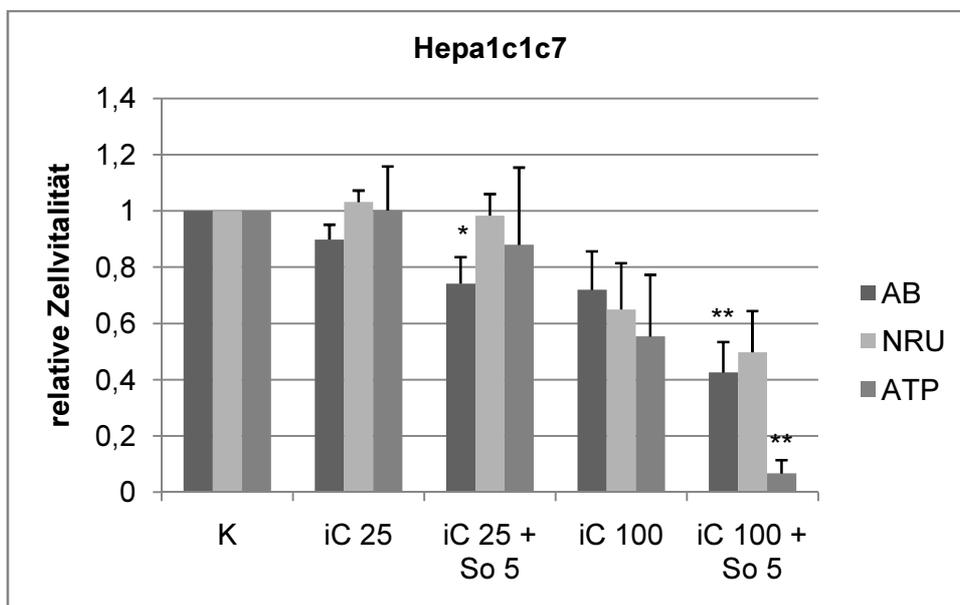


Abbildung 44: Relative Zellvitalität, Hepa1c1c7. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Versuchen. Sowohl bei iCRT3 25µM (iC 25) als auch 100µM (iC100) reduziert die Zugabe von Sorafenib (So 5) die Vitalität meist signifikant. Signifikanz im Vergleich zu iC 25µM (*), Signifikanz im Vergleich zu iC 100µM (**). $p \leq 0,05$ (Student's T-Test).

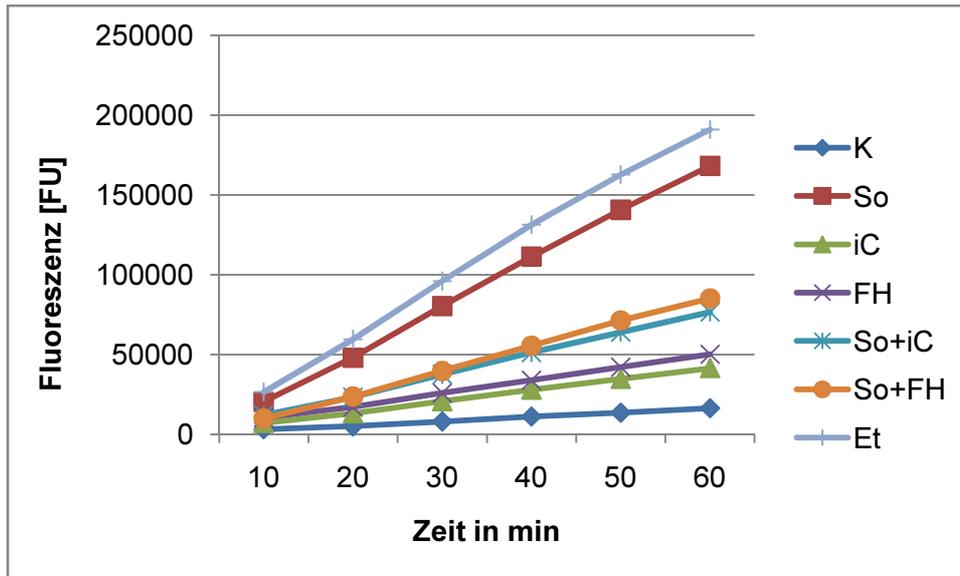


Abbildung 45: Photometrisch gemessene optische Dichte des freigesetzten AFC im Zeitraum einer Stunde in Hepa1c1c7. Das 24h nach Behandlung zur Zellsuspension gegebene DEVD-AFC wird durch Caspase 3 während der Apoptose gespalten. Es zeigt sich ein linearer Anstieg bei allen Behandlungen, die steilste Kurve ergibt sich hier für das stark Apoptose-induzierende Reagenz Etoposid (Et), es folgen Sorafenib (So) und Sorafenib+FH535 (So+FH). Unter den anderen Behandlungen zeigen sich weniger starke Steigungen.

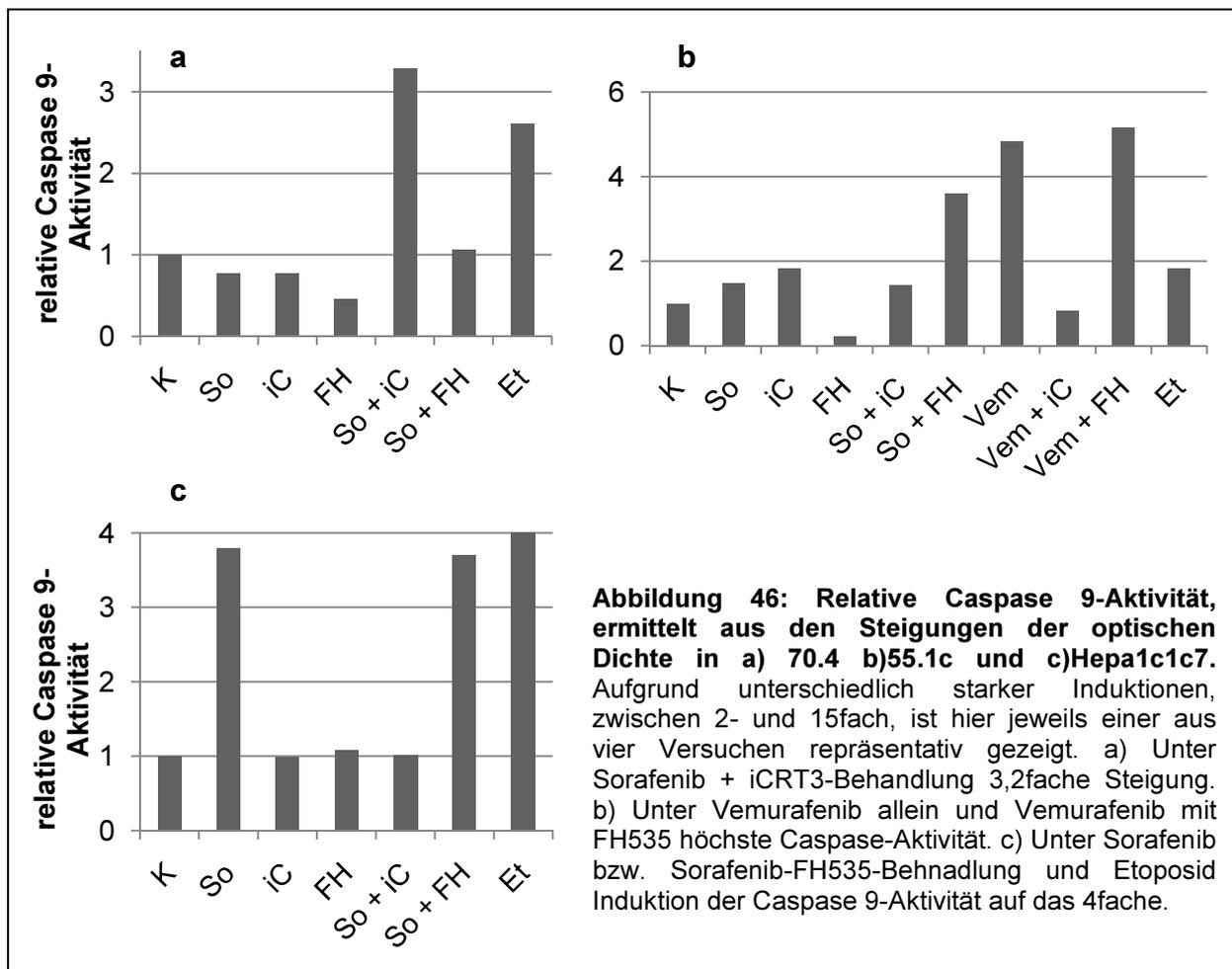
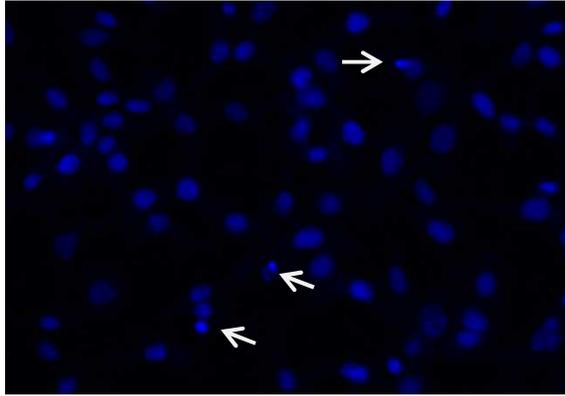
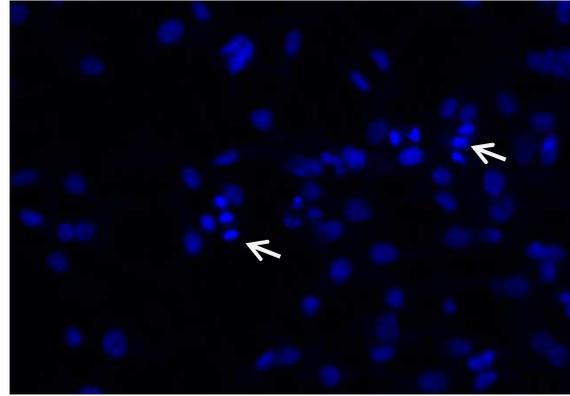


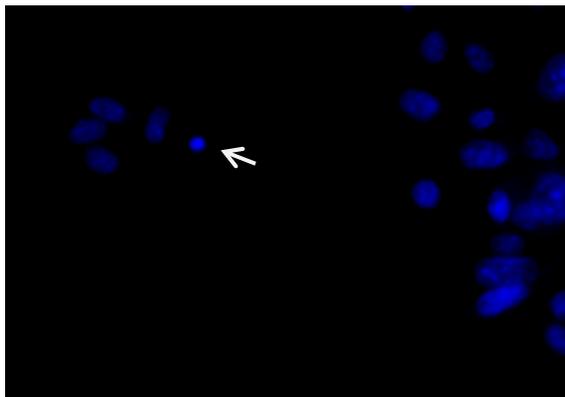
Abbildung 46: Relative Caspase 9-Aktivität, ermittelt aus den Steigungen der optischen Dichte in a) 70.4 b)55.1c und c)Hepa1c1c7. Aufgrund unterschiedlich starker Induktionen, zwischen 2- und 15fach, ist hier jeweils einer aus vier Versuchen repräsentativ gezeigt. a) Unter Sorafenib + iCRT3-Behandlung 3,2fache Steigung. b) Unter Vemurafenib allein und Vemurafenib mit FH535 höchste Caspase-Aktivität. c) Unter Sorafenib bzw. Sorafenib-FH535-Behandlung und Etoposid Induktion der Caspase 9-Aktivität auf das 4fache.



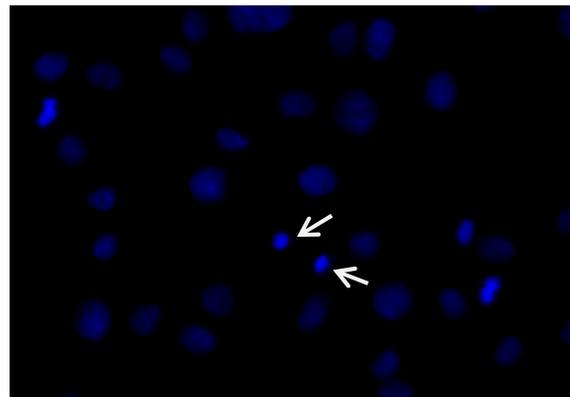
a



b



c



d

Abbildung 47: Behandelte Zellen, nach 20h mit Hoechst-Lösung angefärbt, im Fluoreszenzmikroskop mit 25er-Objektiv. Die weißen Pfeile deuten auf potentiell apoptotische Zellen bzw. Zellen, die vermutlich bald in die Apoptose eintreten. Sie haben einen Chromatinverdichteten, runden, kleinen Kern. a, b) Hepa1c1c7: Sorafenib + FH535 c) 55.1c: Sorafenib + FH535 d) 70.4: Sorafenib + iCRT3

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Interaktion des β -Catenin- und des MAPK-Signalwegs und ihre Rolle in der Tumortheserapieresistenz“

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Prof. Dr. Michael Schwarz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen
2. PD Dr. Albert Braeuning, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert. Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Schwarz für die Vergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Albert Braeuning gilt mein besonderer Dank für die geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen, viele praktische Ratschläge, das Korrekturlesen und insgesamt einer tollen Betreuung.

Bei Herrn Dr. Albrecht Buchmann möchte ich mich für seine Unterstützung bei den Apoptose-Versuchen bedanken, bei Silvia Vetter und Johanna Mahr für ihre Hilfe bei der Zellkultur. Allen Mitarbeitern der Toxikologie danke ich für die positive Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Freunden danke ich für eine unvergessliche gemeinsame Studienzeit.

Besonders danke ich meinem Freund Andreas sowohl für seine technische als auch seelisch-moralische Unterstützung.

Außerdem danke ich meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums.