

Etablierung eines  
fluoreszenzbasierten Zellassays zum  
Screening potentieller  
Krebstherapeutika des Wnt-  
Signalwegs

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von  
Johanna Natalie Apfel  
geboren am 22.05.1986 in Eisenach

Würzburg, 2014

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter : Professor Dr. Oliver Müller

2. Gutachter: Professor Dr. Mike Heilemann

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Textstellen, Tabellen oder Grafiken sind als solche gekennzeichnet. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in anderen Promotionsverfahren vorgelegt wurde.

Teile der Arbeit wurden bereits in „A new fluorescence-based reporter gene vector as a tool for analyzing and fishing cells with activated wnt signaling pathway“ (Apfel, Reischmann, Müller) im Onlinemagazin ISRN Oncology, Ausgabe 2013, veröffentlicht.

Würzburg, Dezember 2014

Johanna Apfel

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

# Zusammenfassung

Der Wnt Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese durch Steuerung der Proliferation, Apoptose, Differenzierung und der Festlegung der Körperachsen im frühen Embryo. Eine Fehlregulation des Signalwegs durch Mutationen in einem der Proteine und Gene dieser hochkomplexen Signalkaskade kann fatale Folgen haben, und ist ein erster Schritt auf dem Weg der Krebsentstehung. Dabei spielt das Protein  $\beta$ -Catenin eine Schlüsselrolle im kanonischen Zweig des Wnt Signalwegs. Durch Steuerung seiner Konzentration im Zytoplasma wird die Expression seiner direkten Zielgene reguliert, da  $\beta$ -Catenin im aktiven Signalweg als Co-Transkriptionsfaktor agiert. Durch Sichtbarmachung dieses Proteins durch fluoreszierende Reporter-genkonstrukte kann der Aktivitätsstatus des Wnt Signalwegs in der Zelle beobachtet werden. Das ermöglicht zum einen genaue Analysen des Signalwegs, wie zum Beispiel das Studium des Zusammenspiels mit anderen Signalwegen. Vor allem aber erlaubt es die gezielte Suche nach Wnt-Signalwegs-modulierenden Substanzen als potentielle Wirkstoffe in der Krebsmedikamentenentwicklung. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Reporter-genkonstrukte für die stabile Transfektion von Zelllinien entwickelt und hinsichtlich eines möglichen Einsatzes sowohl in der Forschung, als auch in Wirkstoffscreenings validiert. Dies umfasst sowohl mehrere Reporter mit  $\beta$ -Catenin als Fusionsprotein, als auch Wnt-Promoter-regulierte eGFP-Reporter, die den Aktivitätsstatus des Wnt-Signalwegs anzeigen. Mit Hilfe dieser Reporter konnten Untersuchungen zur Wirkung des Wnt-Signalwegs auf die Morphologie von transfizierten und nicht-transfizierten MDCK-Zellen durchgeführt werden. Überdies wurde ein promotorregulierter eGFP-Reporter konstruiert, mit welchem transfizierte Zellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg aus einem Zellpool gefischt werden können. Diese Methode ist sowohl für den Einsatz in kultivierten Zelllinien, als auch in der Diagnostik nach der Transfektion primärer Zellen geeignet. Auf Grundlage der neuen Zelllinien wurde weiterhin ein neuer Screeningansatz für potentielle Wnt-Signalwegsinhibitoren entwickelt, der auf dem Ausbleichen der Fluoreszenz in einem Well einer Multiwell-Kulturplatte beruht.

## Summary

The Wnt signaling pathway plays a crucial role in embryogenesis because of its controlling of proliferation, apoptosis, differentiation and defining of the body axes. Mutations in one of the players of this complex pathway are leading to a deregulation, which have fatal consequences in the mentioned fields and are the first steps of a normal cell towards a cancer cell.  $\beta$ -catenin plays a key role in the canonical part of the pathway. Its concentration changes in the cytoplasm regulate the expression of the target genes: when its high concentration leads to a translocation into the nucleus,  $\beta$ -catenin acts as an activator of the transcription complex. By the use fluorescent reporters fused to this protein the activity state of the Wnt signaling pathway can be visualized. This allows the analysis of the pathway and its interaction with others or a specific screen for Wnt modulating substances as potential drugs in the drug development for cancer treatment.

In the present doctoral thesis, several reporter constructs were established for transient and stable transfection of cell lines. They were validated regarding to a possible application in drug screening assays and their use for research. In detail this comprises constructs for tracking  $\beta$ -catenin within a living cell as a fusion protein as well as eGFP reporters which are promoter regulated for monitoring the Wnt signaling state. With the help of these reporters several studies were performed: An analysis of the involvement of the Wnt signaling pathway in morphologic changes in MDCK cells, transfected as well as wild-type, was carried out. Further, an eGFP reporter was shown to be able to fish Wnt active cells out of a pool of different cells after transfection. This approach may be applicable as well in cell research as in diagnostics. Based on the newly generated cell lines a novel careening assay approach was established: While bleaching transfected cells, potential Wnt inhibitors may be found and characterized in a screening assay.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	ii
Summary .....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung.....	1
1.1. Wnt Signalwege.....	1
1.1.1. Der kanonische Wnt Signalweg.....	1
1.1.2. $\beta$ -Catenin als Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs.....	3
1.1.3. Die nicht-kanonischen Zweige.....	3
1.1.4. Die Wnt-Proteinfamilie.....	5
1.1.5. Zielgene des kanonischen Wnt Signalweges.....	6
1.2. Der deregulierte Wnt-Signalweg und Krebs.....	7
1.2.1. Die kolorektale Kanzerogenese.....	8
1.2.2. Der deregulierte Wnt-Signalweg und seine Bedeutung in der Krebsentstehung.....	8
1.2.3. Angriffspunkte im Wnt Signalweg als Therapieansatz.....	9
1.3. Zellbasierte Screening-Assays als Methode zur Wirkstofffindung.....	12
1.3.1. High-Content Screening.....	12
1.3.2. Fluoreszenzbasierte Assays.....	13
1.3.3. Live-Cell Imaging.....	18
1.4. Zielsetzung.....	19
2. Methoden.....	20
2.1. <i>Arbeiten mit Bakterien und Nukleinsäuren</i> .....	20
2.1.1. Transformation von Bakterien.....	20
2.1.2. Maxi-Präparation von bakterieller Plasmid-DNA.....	20
2.1.3. Restriktionsspaltung von DNA.....	20
2.1.4. Gelelution.....	21
2.1.5. Ligation geschnittener DNA.....	21
2.1.6. Polymerasekettenreaktion.....	22
2.1.7. Test-PCR.....	22

2.1.8.	Klonierungsarbeiten .....	23
2.2.	<i>Arbeiten in der Zellkultur</i> .....	26
2.2.1.	Kultivierung einer Zelllinie .....	26
2.2.2.	Zellzahlbestimmung und Vitaltest .....	26
2.2.3.	Kryokonservierung von Zellen .....	26
2.2.4.	Transfektion von Zellen .....	27
2.2.5.	Zelluläre Assays .....	27
2.2.6.	Nachverfolgung von $\beta$ -Catenin bei Wnt-Signalwegsänderungen .....	28
2.2.7.	Untersuchung von Morphologieänderungen in MDCK-Zellen .....	28
2.2.8.	Sortieren von Wnt-aktivierten Zellen mit Hilfe von magnetisch markierten Antikörpern 29	
2.3.	<i>Mikroskopische Methoden</i> .....	30
2.3.1.	Fluoreszenzmikroskopie .....	30
2.3.2.	Arbeiten mit dem Mikroskopiesystem Observer.Z1 .....	30
3.	Materialien .....	33
3.1.	Verwendete Geräte und Software .....	33
3.1.1.	Geräte .....	33
3.1.2.	Verwendete Analysesoftware .....	34
3.2.	Kits und Chemikalien .....	34
3.2.1.	Kits für die Molekularbiologie .....	34
3.2.2.	Kits für die Zellkultur .....	34
3.2.3.	Kits für die Proteinanalyse .....	35
3.2.4.	Puffer und Lösungen .....	35
3.2.5.	Chemikalien .....	36
3.2.6.	Enzyme .....	37
3.3.	Nukleinsäuren .....	37
3.3.1.	Primer und Oligonukleotide .....	37
3.3.2.	Vektorkonstrukte .....	38
3.4.	Zellen und Bakterien .....	38

3.4.1.	Zellen .....	38
3.4.2.	Bakterienstämme .....	38
3.5.	Verbrauchsmaterialien .....	39
4.	Ergebnisse.....	40
4.1.	Konstruktion der Vektoren.....	40
4.1.1.	Vektoren für den Einsatz in Screening-Assays.....	40
4.1.2.	Vektoren für die qualitative Analyse des Wnt-Signalweges.....	42
4.2.	Wahl der Zelllinien.....	44
4.2.1.	Zelllinien für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs .....	44
4.2.2.	Zelllinien für die Inhibierung des Wnt-Signalwegs .....	45
4.2.3.	Zelllinien für Nachverfolgung von $\beta$ -Catenin in der Zelle.....	45
4.3.	Etablierung der Testsysteme zum Screening nach potentiellen Modulatoren des Wnt-Signalweges .....	45
4.3.1.	LiCl-Aktivitätsassay in HEKB-Zellen.....	45
4.3.2.	Aktivitätsassay gekoppelt mit Wnt-Fishing .....	46
4.3.3.	Kompetitiver Aktivitätsassay in HEK293-STEnu4 Zellen.....	50
4.3.4.	Inhibitorischer Assay durch Ausbleichen und Regeneration der Fluoreszenz .....	54
4.4.	Testsysteme für das Live-Cell Imaging des Wnt-Signalweges in transfizierten Zellen.....	57
4.4.1.	pBcat-mcherry .....	57
4.4.2.	pBcatenin-eGFP .....	61
4.4.3.	pBcatenin-SNAP-tag .....	63
4.5.	Nachweis der Wirksamkeit Wnt-Signalwegs-modulierender Substanzen durch Morphologieänderungen von MDCK-Zellen .....	63
4.5.1.	MDCK untransfiziert .....	64
4.5.2.	MDCK- $\beta$ catenin-mCherry .....	65
4.5.3.	MDCK-F3 untransfiziert .....	65
4.5.4.	MDCK-cRaf-mCherry.....	65
5.	Diskussion.....	72
5.1.	Der Wnt-Signalweg als Ansatzpunkt in Medikamentenscreenings.....	72
5.1.1.	Screeningstrategien im Wnt-Signalweg durch Reportergeneinsatz .....	72

5.1.2.	Herstellung neuer Reporterzellen für die Anzeige von Wnt-Signalwegveränderungen	73
5.1.3.	Kompetitiver Assay als Screeningmethode im Wnt-Signalweg	81
5.2.	Bleaching als Screeningmethode im Wnt Signalweg	85
5.2.1.	Untersuchungen des Wnt-Signalweges durch Bleaching	85
5.2.2.	Zeitaufgelöstes Bleaching	86
5.2.3.	Endpunktbestimmung mittels Bestrahlungskammer	87
5.3.	Morphologieveränderungen durch den Wnt Signalweg	87
5.4.	Bewertung der Ergebnisse	90
5.4.1.	Bewertung der promotorregulierten Reporter	90
5.4.2.	Bewertung der $\beta$ -Catenin-Reporter	91
5.4.3.	Bewertung des Screenings durch Bleaching	92
5.4.4.	Bewertung der Untersuchungen zur Morphologieveränderung von MDCK-Zellen	94
5.4.5.	Fazit der Arbeit	95
5.5.	Ausblick	96
6.	Anhang	97
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	97
6.2.	Technische Daten des Grundvektors pDisplay	99
6.3.	Spezifikationen der Bestrahlungsaufbauten	100
6.3.1.	LED-Kammer für den Gebrauch im Brutschrank	100
6.3.2.	Spezifikation des Bestrahlungsaufbaus der TU Kaiserslautern	101
6.4.	Danksagung	102
6.5.	Literaturnachweise	103

# 1. Einleitung

## 1.1. Wnt Signalwege

Die ersten Proteine des Wnt Signalwegs wurden zwischen Ende der 1980er und Anfang der 1990er Jahre beschrieben. Es wurde bekannt, dass das Genprodukt *wingless (wg)*, zuständig für die embryonale Entwicklung in *Drosophila*, und *Int1* (engl. *murine mammary tumor virus integration site*), welches bei der Entstehung von Tumoren in der Maus eine Rolle spielt, derselben, hochkonservierten Genfamilie angehören. Somit wurden die Bezeichnungen zu *Wnt* zusammengeführt [1]. Neunzehn Mitglieder der Familie sind heute bekannt. Diese löslichen Glykoproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie an einen der so genannten Frizzled-Transmembranrezeptoren an der Zelloberfläche binden und eine Signalkaskade in Gang setzen, die als Wnt Signalweg bezeichnet wird. Die Art und Weise des Signalfortschritts, und damit dessen Wirkung, ist abhängig vom Muster der insgesamt zwölf bisher bekannten Frizzled-Rezeptoren [2][3], deren Co-Rezeptoren LRP5 / LRP6 (engl. *low-density lipoprotein-receptor-related protein*), Ryk oder Ror2 [4] und des bindenden Wnt-Liganden [5][6]. Je nachdem steuern sie damit drei Hauptsignalkaskaden: den  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen Signalweg, den Weg der planaren Zellpolarität (engl. *planar cell polarity PCP*) und den Calcium-abhängigen nicht-kanonischen Weg. Obwohl diese Signalwege keinem distinkten, linearen Pfad folgen, gibt diese Einteilung eine Übersicht über die Auswirkungen der Wnt-Proteine auf die Zell-Adhäsion, morphogenetische Bewegung sowie der Zell-Adoleszenz und -Differenzierung.

### 1.1.1. Der kanonische Wnt Signalweg

Im Zentrum des kanonischen Wnt Signalweges steht das Protein  $\beta$ -Catenin. In einer differenzierten Zelle, in der der kanonische Signalweg inaktiv ist, ist  $\beta$ -Catenin an den so- genannten destruction complex (engl. Zerstörungskomplex) gebunden, bestehend aus Axin, dem Tumorsuppressor *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, *glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ )*, die *casein kinase 1 (CK1 $\alpha$ )* und *protein phosphatase 2A (PP2A)* [7], und wird durch die Kinasen GSK3 $\beta$  und CK1 $\alpha$  phosphoryliert. Dadurch erfolgt von der Komponente  $\beta$ -TrCP eine kovalente Ubiquitylierung. Ubiquityliertes  $\beta$ -Catenin wird von Proteasen des cytosolischen Proteasoms erkannt, was zum Abbau von  $\beta$ -Catenin führt [8]. Im Zytoplasma stellt sich somit ein niedriges *steady-state* an  $\beta$ -Catenin ein (Abbildung 1 links). Es findet keine Zielgenexpression statt – im Zellkern wird der Transkriptionsfaktor TCF/LEF (*T-cell factor, lymphoid enhanced factor*) vom Suppressor Groucho gebunden. Bindet ein Wnt-Ligand, zum Beispiel Wnt3A, extrazellulär an einen der Frizzled-Rezeptoren (Fz) und LRP6, kommt es zur Aktivierung des kanonischen Signalweges (Abbildung 1 rechts): In einem komplexen Phosphorylierungsschritt, an dem vor allem die Proteine GSK3 $\beta$ , das zytoplasmatische Gerüstprotein

*dishevelled* DVL, Axin und der Fz-Rezeptor selbst beteiligt sind, wird der Co-Rezeptor LRP6 phosphoryliert [5]. Daraufhin zerfällt der *Destruction Complex* und  $\beta$ -Catenin wird nicht länger für den Abbau markiert – folglich steigt dessen Konzentration im Zytoplasma. Es folgt eine Translokation in den Zellkern – hierbei spielen auch wieder die Proteine APC und Axin eine Rolle. Durch seine erhöhte nukleäre Konzentration verdrängt  $\beta$ -Catenin den Suppressor Groucho an TCF/LEF und fungiert dadurch als Aktivator des Transkriptionsfaktors LEF/TCF. Zusammen mit den Co-Aktivatoren *B-cell lymphoma 9* und *Pygopus* wird die Zielgenexpression initiiert [9]. Der  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalweg reguliert damit in erster Instanz die Proliferation und das Zellüberlebensprogramm. Auf der nächsten Ebene werden durch diese Genprodukte wiederum eine ganze Kaskade weiterer Zielgene in Gang gesetzt, welche den Wnt Signalweg mit anderen Signalwegen zu einem Netzwerk verknüpft [10] (siehe auch Abschnitt 1.1.5). In verschiedenen Studien wurden bis zu 287 Proteine in Zusammenhang mit der Aktivierung des kanonischen Signalweges gestellt [11], [12], [13], [14].

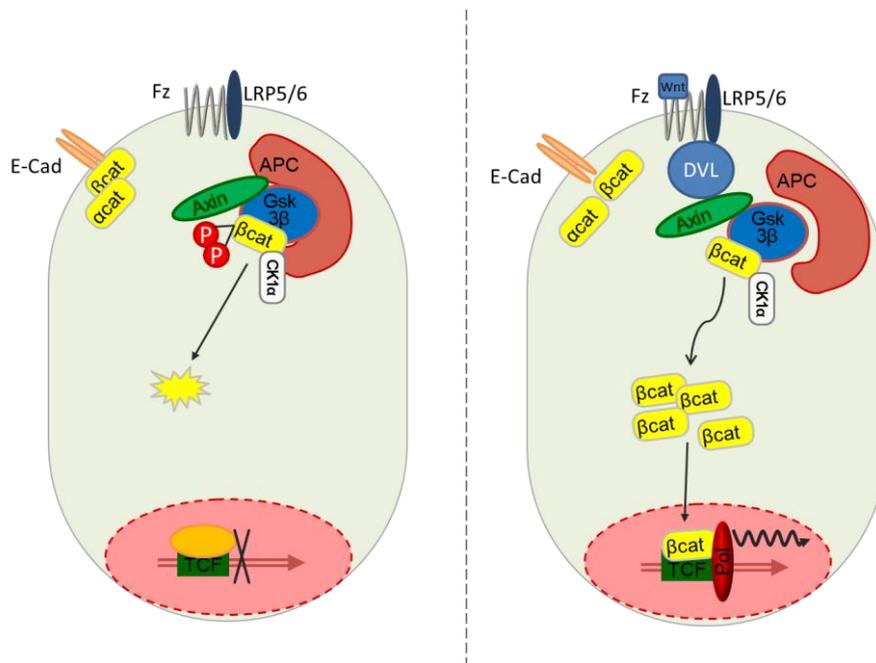


Abbildung 1: Der kanonische Wnt Signalweg. Links: Inaktiv.  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ cat) wird gebunden, phosphoryliert und ubiquitinyliert und dadurch zum Abbau markiert. Im Zellkern sind die Zielgene durch den Repressor Groucho blockiert, es findet keine Expression statt. Ein zusätzlicher Pool an  $\beta$ cat ist an der Zellmembran durch E-Cadherin (E-Cad) lokalisiert. Durch Aktivierung des Signalwegs (rechts) durch die Bindung eines Wnt-Liganden an Frizzled (Fz), signalisiert das Protein Dishevelled (DVL) den Zerfall des *destruction complex*. Es erfolgt eine Konzentrierung von  $\beta$ cat im Cytosol und anschließend eine Translokation in den Zellkern. Hier bindet  $\beta$ cat an TCF und fungiert so als Transkriptionsfaktoraktivator. Eine Expression der Zielgene kann nun stattfinden.

### 1.1.2. *β-Catenin als Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs*

Als konzentrationsregulierter Transkriptionsfaktor nimmt  $\beta$ -Catenin eine Schlüsselposition im kanonischen Wnt Signalweg ein. In Krebszellen, die eine Mutation im Wnt-Signalweg tragen, wird durch  $\beta$ -Catenin eine ununterbrochene Proliferation in Gang gesetzt [15]. Aber auch eine reduzierte Mortalität oder Differenzierung dieser Zellen sind Folgen. Dabei spielt  $\beta$ -Catenin nicht nur wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben in der Genregulation eine große Rolle. Zusätzlich reguliert ein weiterer Pool an  $\beta$ -Catenin die Zell-Zell-Adhäsion. Die Trennung beider Pools wird durch differenzierte Phosphorylierung gesteuert. Im kanonischen Wnt Signalwegzweig wird  $\beta$ -Catenin durch CK1 an der Position S45 initial phosphoryliert, es folgen Phosphorylierungen an Thr4a, Ser37 und Ser33 durch GSK3 $\beta$  [16]. Dies markiert  $\beta$ -Catenin für die Ubiquitinylierung und den proteosomalen Abbau.

Zusammen mit E-Cadherin bildet  $\beta$ -Catenin *adherence junctions* (engl.: „Adhärenz Knotenpunkte“, AJ) [17], und ist so für eine korrekte Zellarchitektur zuständig. Dabei bindet  $\beta$ -Catenin mit seiner Armadillo Domäne an E-Cadherin und steuert so außerdem die  $\alpha$ -Catenin Dimerisierung in den Zell-Zell-Kontakten [18]. Zusätzlich ist es an der Bildung von Membranausstülpungen und der Stabilisierung von Mikrotubuli in der Membran beteiligt [19][20]. Phosphorylierungen an Ser834, Ser836 und Ser842 durch die beiden genannten Kinasen verstärken die Bindung des  $\beta$ -Catenins an E-Cadherin, während Phosphorylierungen an Tyr831, Tyr860 und S846 diese Interaktion verhindern [4]. Durch diese Knotenpunkte ist  $\beta$ -Catenin auch indirekt am normalerweise  $\beta$ -Catenin-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  /Wnt Zweig beteiligt: wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle entfernt, zerfallen die AJs und  $\beta$ -Catenin steht für den kanonischen Zweig zur Verfügung [21][22]. Die darauffolgende Expression der Zielgene unterscheidet sich jedoch von jener nach kanonischer Aktivierung und ist abhängig vom Zelltyp [22]. Umgekehrt bewirkt die Aktivierung des kanonischen Signalwegs – durch Inhibierung der GSK3 $\beta$  – in sich bewegenden Zellen die Lokalisierung des  $\beta$ -Catenins an die Zellmembran und leistet einen Beitrag zur Zellmotilität [18].

### 1.1.3. *Die nicht-kanonischen Zweige*

Neben dem kanonischen Signalweg werden noch zwei weitere Zweige dem Wnt-Signalweg zugeordnet, welche allerdings größtenteils getrennt von  $\beta$ -Catenin ablaufen: Der Weg der planaren Zellpolarität (PCP) und der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  Zweig (Abbildung 2). Während ersterer vor allem in der Embryonalentwicklung für die Ausbildung der Orientierungsachsen zuständig ist, ist letzterer für die Zellbeweglichkeit und –ausrichtung entscheidend [23].

Die Bindung von Wnt-Liganden an den Fz-Rezeptor führt über eine G-Protein-gekoppelte Reaktion zu einer Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase C (PLC). Außerdem wird ein *second messenger* freigesetzt: Inositoltriphosphat (IP3). Durch das Öffnen von Calciumionenkanälen bewirkt

dieser eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und hydrolysiert anschließend zu einem weiteren *second messenger*, 1,2-Diacylglycerol (DAG), welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Durch den Calciumionen-Influx wird außerdem die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2 aktiviert (CaMKII). Beide Kinasen aktivieren schließlich weitere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NFAT. Die Auswirkungen dieser Signalwegaktivierungen sind abhängig vom zellulären Kontext [24], spielen aber eine Rolle in der Proliferation, Angiogenese, Zellmotilität und bei Entzündungsreaktionen [3].

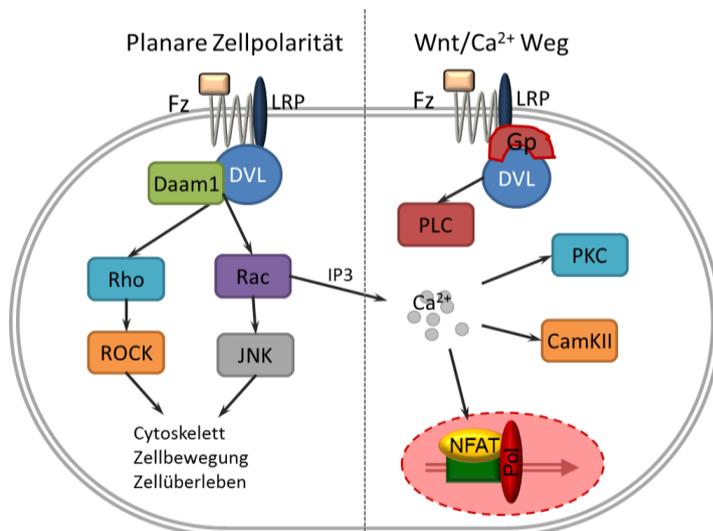


Abbildung 2: Die zwei  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Signalwegzweige der planaren Zellpolarität und des Wnt/Calcium Wegs. Links: Der Zweig der planaren Zellpolarität bewirkt über mehrere Schritte die Regulation von Zellbewegung und Zellbewegung und steuert auch die Polarität der Zellen während der Embryonalentwicklung. Rechts: Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Zweig spielt abhängig vom Zelltyp eine große Rolle in der Genregulation.

Der PCP-Weg ist neben dem  $\text{Ca}^{2+}$ /Wnt Weg der zweithäufigste erforschte Signalwegzweig und wurde vor allem in *Drosophila* charakterisiert [25]. Er steuert die Polarisation der Zellen entlang der embryonalen Achsen. Initiiert wird der PCP-Weg ebenfalls durch die Anbindung eines nicht-kanonischen Wnt-Liganden an einen Fz-Rezeptor, aber zusammen mit ROR2. Dadurch wird das Skelettprotein Dishevelled DVL an die Membran lokalisiert und von Daam1 sowie RhoA gebunden. Dieser Komplex wiederum aktiviert JNK und organisiert dadurch Prozesse der Zellbewegung und Polarität [24].

Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass der kanonische Signalwegzweig und die  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Signalwegzweige getrennt voneinander ablaufen. Wie allerdings schon in Kapitel 0 angedeutet, können beide nicht als distinkt autonom angesehen werden – es gibt mehrere Überschneidungsstellen [3]. Je nach Kontext der Fz-Rezeptoren auf der Zelloberfläche können gleiche Wnt-Liganden verschiedene Reaktionen hervorrufen [6]. Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass manche Wnt-Liganden über Calcium auf die nukleäre  $\beta$ -Catenin-Konzentration wirken und diese

stabilisieren können: intrazelluläres Calcium führt auch zu einem erhöhtem nukleären Calciumspiegel, was wiederum den Influx von Makromolekülen erleichtert [23]. Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Mitglieder der Wnt-Liganden und deren multifunktionale Wirkung beschrieben.

#### 1.1.4. Die Wnt-Proteinfamilie

Die Glykoproteine der Wnt-Familie sind strukturell hoch konservierte sekretierte Signalproteine, die sich in fast allen Lebewesen wiederfinden (Wirbeltiere, *Drosophila*, Nematoden). Sie binden durch ihre Glykosilierungsstelle an die verschiedenen Frizzled-Rezeptoren und wirken fast ausschließlich über eine kurze Reichweite zwischen benachbarten Zellen. Fast alle Wnt-Liganden besitzen eine direkte oder indirekte Wirkung in der Embryonal- und Zellentwicklung. Durch ihre geringe Reichweite wirken sie oft nur lokal in bestimmten Körperregionen oder Zelltypen. In Tabelle 1 sind die einzelnen Proteine und deren Zellspezifität zusammengestellt.

Die ursprüngliche Einteilung der 19 Wnt-Liganden in „kanonisch“ und „nicht-kanonisch“ erfolgte danach, ob die Zugabe der Proteine zur Ausbildung einer zweiten Körperachse in Xenopusembryonen führte [26]. Klassischerweise wurden demnach die Mitglieder der Wnt-Familie Wnt1, 2, 3, 3a, 8, 8b und 10b als kanonisch bezeichnet, da sie über den  $\beta$ -Catenin-abhängigen Weg agieren, während Wnt4, 5a, 5b, 6, 7 und 11 keine Wirkung auf eine Transformation haben [27][23].

Wnt3a ist das Wnt-Protein des kanonischen Signalweges, das am besten charakterisiert ist. Der Ligand spielt eine Rolle im Zellwachstum, in der Proliferation und im Zellüberlebensprogramm [28]. In der Embryonalentwicklung steuert er das Muster der Achsenbildung, die mesoderme Ausbildung und die Somitenbildung, verhindert jedoch eine Differenzierung der Zellen [29]. Auf molekularer Ebene bewirkt Wnt3a eine Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins im Zellkern durch Inhibierung der GSK3 $\beta$  im *destruction complex*. Vermutlich geschieht dies aber nicht direkt durch Dephosphorylierung des  $\beta$ -Catenins, sondern durch andere nukleäre Faktoren [30], wie einer Feedback-Regulation durch Anstieg der LEF-1-Expression.

In den letzten Jahren wurde vermehrt gezeigt, dass vor allem Wnt5a sowohl in dem einen, als auch dem anderen Signalwegzweig agiert, abhängig vom Rezeptorkontext auf der Zelloberfläche [27], [31]. Ein neuer Bericht zeigt sogar, dass Wnt3a, 4, 5a, 7a, 9b und 10b alle einen Effekt auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration haben, was komplett gegensätzlich zur klassischen Einteilung steht. Wnt3a beispielsweise vernetzt den kanonischen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ /Wnt-Signalweg über die Aktivierung von DVL und damit der Regulation des *second messengers* IP3 (siehe Kapitel 1.1.3).

Proteinname	Funktion / Vorkommen
Wnt-1	Spielt eine Rolle in der Funktion von Osteoblasten und der Knochenentwicklung
Wnt-2b	Isoform 1 wird im adulten Herz, Gehirn, der Placenta, Lunge, Prostata und Hoden, Eierstock, Dünn- und Dickdarm exprimiert. Wurde auch in embryonalem Hirn, Lunge und Niere detektiert.
Wnt-2	Isoform 2 in embryonalem Gehirn, Lunge, Niere, in Hoden und Krebszelllinien Im Gehirn, vor allem im Thalamus, in der Placenta und in der Lunge
Wnt-3 und Wnt-3a	Wnt-3 und Wnt-3a spielen in der Zell-Zell-Signalübertragung während der Morphogenese des Neuralen Rohr eine wichtige Rolle. Wnt3a wird in geringen Konzentrationen in der adulten Lunge, Milz und Prostata exprimiert.
Wnt-4	Überexpression wird mit abnormaler Proliferation in Brustgewebe in Verbindung gebracht.
Wnt-5a	Vielfältige Funktionen im kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg, abhängig vom Rezeptorkontext. Erhöhte Expression in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, außerdem in normalen Zellen des Stromas.
Wnt-7a	Bewirkt eine sexuell dimorphe Entwicklung der Müllerschen Durchgänge Expression beschränkt sich auf die Plazenta, Niere, den Hoden und Uterus, fetale Lunge und adultes Gehirn
Wnt-8a und Wnt-8b	Spielen eine Rolle in der Entwicklung des Vorderhirns, vor allem des Hippocampus.
Wnt-9b	Schwach exprimiert in Niere und Gehirn.
Wnt-16	Isoform Wnt-16b schwach exprimiert in peripheren Lymphorganen wie Milz, Blinddarm und Lymphknoten Wnt-16a signifikant exprimiert in der Bauchspeicheldrüse.
Wnt-10b	In fast allen adulten Geweben, am höchsten im Herzen und Skelettmuskel. Im kleinkindlichen Gehirn ist die Konzentration höher als im Adulten
Wnt-11	In fetaler Lunge und Niere, adultem Herzen, Leber, Skelettmuskeln und Pankreas
Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7b, Wnt-9a, Wnt-10a	Kein bestimmter Zielort zuzuordnen

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Wnt-Liganden und deren gewebespezifisches Vorkommen bzw. Wirkung. Quelle: Datenbankabfrage [www.uniprot.org/uniprot](http://www.uniprot.org/uniprot)

### 1.1.5. Zielgene des kanonischen Wnt Signalweges

Seit von der klassischen Sicht der autonomen Signalwegzweige des Wnt Signalnetzwerkes Abstand genommen wurde, werden immer mehr Gene und Proteine bekannt, die auf eine Aktivierung durch Wnt-Liganden reagieren. Je nach Technik werden entweder die direkten Auswirkungen, zum Beispiel durch Phosphorylierungskaskaden, oder die Expressionsänderungen getestet [32]. Dazu kommt, dass sich die Reaktionen abhängig vom Zelltyp unterscheiden können [33]. Beschränkt man sich allein auf die direkten Auswirkungen durch  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF-vermittelten Transkriptionsstart, ergibt sich schon ein komplexes Bild an Zielgenen, die in der Proliferation, Apoptose, dem Zellzyklus und Metabolismus sowie der Zelladhäsion eine Rolle spielen [32]. Die bekanntesten Vertreter sind c-myc

[14], c-jun [34], Cyclin D1 [35] und PPAR $\delta$  [36], wobei es allerdings vermutlich „keine universellen Wnt/TCF Zielgene gibt“ [33]. Verfolgt man den Weg des Transkriptionskomplexes nur ab Cyclin D1 weiter, findet man Überschneidungen zu weiteren Signalwegen, wie etwa dem p53 Signalweg, der Fokalen Adhäsion oder dem Zellzyklus (Quelle: KEGG Pathway Datenbankabfrage zu Cyclin D1). Zahlreiche Feedback und Feed-Forward- Regulationen betreffen zum Beispiel die Genprodukte Frizzled, LRP, Axin2 oder TCF/LEF [33] und stellen sicher, dass dieses komplexe Netzwerk korrekt abläuft, das heißt, die richtigen Zweige zur richtigen Zeit an- oder auch ausgeschaltet werden. Wird die Regulation durch Mutation an einer Stelle gestört, kann das ganze Netzwerk außer Kontrolle geraten – die Folge ist der erste Schritt auf ihrem Weg von einer normalen Zelle zu einer entarteten Tumorzelle [37].

## 1.2. Der deregulierte Wnt-Signalweg und Krebs

Krebs ist eine Bezeichnung für entartete Zellen im Körper, bei denen das Fehlen eines korrekten Regulationsmechanismus zu verschiedenen Krankheitsbildern führt. Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert den Begriff so:

„Cancer is a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body. Other terms used are malignant tumours and neoplasms. One defining feature of cancer is the rapid creation of abnormal cells that grow beyond their usual boundaries, and which can then invade adjoining parts of the body and spread to other organs. This process is referred to as metastasis. Metastases are the major cause of death from cancer.“ (www.who.int/cancer).

Mit 13 % führten Krebskrankheiten 2008 die Liste der jährlichen Todesursachen an. Die am weitesten verbreiteten Krebsarten sind die der Lunge, des Magens, der Leber, des Darmes, der Brust und Zervixkarzinome. Zusammengenommen ergaben das 4,142 Millionen Tote im Jahr 2008. Darmkrebs, insbesondere das kolorektale Karzinom (engl. *Colorectal cancer*, CRC), ist dabei in der Hinsicht die inzwischen am besten untersuchte und charakterisierte Krankheit, dennoch belief sich die Zahl der Neuerkrankungen 2012 auf etwa 14.200 allein in den USA [38]. Die Möglichkeiten zur Therapie werden vor allem durch das Auffinden neuer Biomarker und kleiner therapeutischer Moleküle täglich erweitert [39]. Die Grundlage dafür ist, alle wichtigen Schlüsselrollen der kolorektalen Kanzerogenese zu kennen und dadurch abzuleiten, welche Spieler zum Ziel der Therapie geeignet sind. Die folgenden Abschnitte befassen sich genauer mit dem Kolorektalkarzinom, insbesondere den sporadischen Tumoren.

### *1.2.1. Die kolorektale Kanzerogenese*

Seit einem Vierteljahrhundert ist bekannt, dass Mutationen von bestimmten Genen die ersten Schritte auf dem Weg der Krebsentstehung (Kanzerogenese) sind [40], [41]. Diese Veränderungen betreffen vor allem Gene, die für molekulare Schalter in verschiedenen Signalwegen agieren. Solche Schlüsselproteine sind zum Beispiel für die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose oder der Zellteilung zuständig. Eines dieser Schlüsselproteine ist APC, das in 80 % der CRCs mutiert ist und vermutlich sogar das in diesen Karzinomen zuerst eingetretene Ereignis darstellt [42]. In nur 5 % dieser Fälle ist die Mutation erblich begründet (genannt FAP: Familial Adenomatous Polyposis) [38]. Der allgemeine Ablauf der Kanzerogenese wird so interpretiert, dass nach einer ersten Mutation in einem Protoonkogen oder einem Tumorsuppressorgen Neoplasien entstehen. Nach Mutation von vier oder fünf weiteren Genen entwickelt sich der Tumor über Jahre hinweg, bis anschließend die genetischen Veränderungen so groß werden, dass sich der Tumor komplett von den umgebenden Zellen unterscheidet und als maligne eingestuft wird. Inzwischen sind drei Hauptwege bekannt, die während der kolorektalen Kanzerogenese ablaufen (können): den der chromosomalen Instabilität (CIN), der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der CpG-Inselmethylierung (*CpG Island Methylated Phenotype* CIMP) [38].

CIN betrifft 65 bis 70 % der sporadischen CRCs und zeichnet sich durch den Verlust oder der Verdopplung von Chromosomenabschnitten oder ganzer Chromosomen aus. Die Folge ist ein Chromosomenungleichgewicht, sodass mitotische Unregelmäßigkeiten erhöht werden. MSI tritt auf, sobald der zelleigene DNA-Reparaturmechanismus nicht mehr funktioniert und dabei sogenannte Mikrosatelliten, kurze repetitive Sequenzen, in der DNA mutieren oder vermehrt werden. Erkannt werden sie durch gehäufte frameshift-Mutationen in diesen Bereichen. CIMP ist ein Ausdruck für das multiple Stilllegen mehrerer Gene durch epigenetische Veränderungen, zum Beispiel Hypermethylierungen von CpG-Inseln in Promoterregionen. Ein prominentes Beispiel ist auch hier das APC-Gen, das sehr häufig in sporadischen CRCs durch CIMP stillgelegt wird.

### *1.2.2. Der deregulierte Wnt-Signalweg und seine Bedeutung in der Krebsentstehung*

Der Wnt Signalweg wurde seit seiner Entdeckung vielfach in Zusammenhang mit Krebs gebracht, sobald eine Mutation in einem der Spieler des Signalweges zu einer nicht mehr korrekten Regulation führt [42], [43], [44], [45], [46]. Schon seit 2005 ist bekannt, dass 90 % aller sporadischen Tumore des kolorektalen Karzinoms eine Mutation in einem Gen tragen, das mit dem Wnt-Signalweg in direkter Verbindung steht und zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs führen [47]. Vor allem sind hier Mutationen von APC oder dem  $\beta$ -Catenin-Gen CTNNB1 zu nennen, die am häufigsten, aber oft getrennt voneinander in verschiedenen Tumoren auftreten [44]. 50 % der CRCs mit Wildtyp-APC

haben eine Mutation in CTNNB1 in der Phosphorylierungsstelle von GSK3 $\beta$  [24], was direkt zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin-Konzentration im Zytoplasma und damit der erhöhten Ablesung der Wnt-Zielgene, vor allem c-myc und Cyclin D1 führt. Aber auch in epithelialen Tumoren wurden Punktmutationen in CTNNB1 gefunden, ebenso wie in akuter myeloidischer Leukämie [48]. In Karzinomen des Gallentrakts spielt laut einer Studie von 2010 ein deregulierter Wnt-Signalweg vermutlich auch eine Rolle [49].

Neben seiner Rolle im Wnt Signalweg hat APC noch weitere Funktionen in der Zellregulation, Adhäsion und der Bildung des Spindelapparats [50]. Ein Verlust dieses Proteins hat somit gleich eine multiple Auswirkung auf die Zelle. Durch Feedback-Regulationen kommt es außerdem zu unterschiedlichen Reaktionen der umgebenden Zellen, sodass mehrere Signalwege zugleich auf den Wnt-Signalweg wirken, wie etwa der Notch Signalweg, Hedgehog, R-Spondin, oder K-Ras [44]. In 40 % der Brustkrebsfälle wurde eine inaktivierende Methylierung des APC-Promotors entdeckt [51]. Mutationen des Strukturproteins Axin wurden ebenfalls mit Krebs, besonders Leberkarzinomen, in Verbindung gebracht [48], [52]. Infolge von Axin2-Mutationen wurde in manchen CRCs ein defekter DNA-Reparaturmechanismus festgestellt [52]. Eine fehlerhafte Überexpression von DVL kann zur Entwicklungen von Lungenkrebs führen [53].

### *1.2.3. Angriffspunkte im Wnt Signalweg als Therapieansatz*

Aufgrund seiner Bedeutung in Krebs und der Krebsentstehung wird der Wnt Signalweg als ein mögliches Ziel bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten angesehen. Je nach Art der vorhandenen Mutationen und deren Auswirkungen gibt es mehrere Ansätze, die für ein Blockieren des aktivierten Wnt Signalweges geeignet sind. In Tabelle 2 sind die möglichen Strategien mit Beispielen aufgelistet.

Eine interessante Entdeckung war, dass Axin zwar ebenfalls onkogen sein kann, allerdings in Zellen mit APC-Mutation der Wirkung dieser Mutation durch  $\beta$ -Catenin-Destabilisierung entgegenwirkt [24]. Die bekanntesten natürlichen Inhibitoren des kanonischen Wnt-Signalwegs stellen die Dickkopf-Proteine Dkk dar. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe sekretorischer Proteine, welche an den Co-Rezeptor LRP anbinden und ihn dadurch internalisieren können und somit die Anbindung der Wnt-Liganden verhindern [54]. Dkk-3 wird außerdem als ein Tumorsuppressor in einer Schlüsselrolle angesehen, da es in einer Vielzahl verschiedener Tumoren als Wnt-Antagonist auftritt [55][56]. Ein weiteres Mitglied in dieser Hinsicht ist die Kinase GSK3 $\beta$ , obwohl bisher noch keine mutierten Formen beschrieben wurden. Sie spielt aber eine entscheidende Rolle in der Degradation von  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung. Darüber hinaus ist GSK3 $\beta$  allerdings noch in zahlreichen weiteren Signalwegen beteiligt, wie beispielsweise dem ErbB Signalweg, Hedgehog, dem Insulin Signalweg, dem Chemokin-Signalweg, aber auch in der Zellzyklusregulation, der Axonbildung oder der Fokalen Adhäsion (Quelle: KEGG pathway Datenbankabfrage über GSK3 $\beta$  <http://www.kegg.jp/dbget->

bin/www\_bget?K03083). Dies betont die Komplexität des Wnt Signalwegs als Netzwerk und seiner integralen Bedeutung in der Regulation anderer Signalwege, aber auch, dass der Angriff einer dieser Spieler mitunter fatale Folgen für weitere Signalwege haben könnten. Es ist nicht absehbar, wie sich das auf einen adulten Organismus auswirken kann. Die Hoffnung ist, ein einziges Protein ausschalten zu können und damit die direkten Folgen der Fehlregulation zu verhindern.

Angriffspunkt	Beispiele
<b>Abfangen von Wnt-Liganden vor deren Bindung an die Rezeptoren</b>	Anti-Wnt-Antikörper, lösliche Frizzled-Rezeptoren (z.B. sFRP1) [57]
<b>Blockieren der Fz/LRP Rezeptoren</b>	FJ9 blockiert die Anbindung von Wnts an Fz [53]
<b>Stabilisierung des <i>destruction</i> Complex</b>	Einbringen von wild type Axin1 [57] XAV939 stabilisiert Axin [58]
<b>Intrazelluläres Abfangen von <math>\beta</math>-Catenin</b>	Einbringen von antisense RNA (RNAi)[57][59] NSAIDs destabilisieren $\beta$ -Catenin [60][61]
<b>Verhinderung der Translokation von <math>\beta</math>-Catenin in den Nukleus</b>	FH535 über einen nicht näher bekannten Mechanismus [62]
<b>Inhibition des Transkriptionskomplexes mit <math>\beta</math>-Catenin/TCF/LEF</b>	Vitamin A Derivate können $\beta$ -Catenin in der Zelle destabilisieren und die Wnt-vermittelte Transkription inhibieren [57] FH535 unterbindet die $\beta$ -Catenin/TCF-Komplexbildung [36] Histon-Deacetylasen (HDACs) können zu einem <i>silencing</i> der TCF-Bindungsstellen durch Stabilisierung von Groucho führen [57]
<b>Aktivierung natürlicher Wnt-Antagonisten</b>	Sekretierter Wnt-Inhibitor Faktor (WIF-1) [56] Dickkopf-Proteine [55]
<b>Systemische Inhibition des Wnt-Signalweges</b>	Moleküle, deren genauer Mechanismus bisher nicht bekannt ist oder deren Wirkung indirekt ist. Beispiele: IWR Moleküle ( <i>inhibitors of Wnt response</i> )[63] Gleevec/Imatinib [64]

Tabelle 2: Auflistung möglicher Angriffspunkte für Therapeutika im Wnt-Signalweg und Beispiele von *small molecules*, die in eine jeweilige Kategorie einzuordnen sind.

In jüngerer Vergangenheit wurden diese Hoffnungen durch die Konzentration auf Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht genährt, die potentiell therapeutisch einsetzbar wären. Diese *small molecules* sollen den Signalweg an einer bestimmten Stelle modifizieren und somit die Folgen der genetischen Veränderungen chemisch überbrücken [63]. Oftmals ist der genaue Mechanismus nicht näher bekannt oder wirkt indirekt über die Modulation von Antagonisten oder andere Signalwege. Das prominenteste Beispiel ist das von Novartis vertriebene Medikament Gleevec, das zur Behandlung chronisch myeloidischer Leukämie eingesetzt wird. Es inhibiert unter anderem eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin durch die Inhibierung der Kinase Bcr-Abl oder der Kinase c-kit, und gehört somit zu den indirekten Modulatoren [64][57]. Im Folgenden wird näher auf die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren eingegangen.

Bereits seit Anfang der 90er Jahre ist eine Studie bekannt, in der Aspirin eine mögliche Senkung des Krebsrisikos zugesprochen wird [60]. In deren Folge wurden weitere Anstrengungen in der Erforschung ähnlicher NSAIDs (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) wie Aspirin

unternommen. Inzwischen ist bekannt, dass NSAIDs unter anderem durch Inhibierung der von COX-2 (*fatty acid cyclooxygenase*) -vermittelten Prostaglandinbildung wirken. Weiterhin haben sie zahlreiche Wirkungen in inflammatorischen Prozessen. Vor allem in CRCs wurde ihre chemopräventive Wirkung beschrieben [60][65].

FH535, ein *small molecule*, welches in einem  $\beta$ -Catenin/TCF-Bindungsassay entdeckt wurde, wurde als ein potenter Wnt-Inhibitor vorgestellt und bisher vielfach experimentell eingesetzt [36], [62], [66], [67]. Es führt sowohl zum Abfangen von cytosolischem  $\beta$ -Catenin, der Verhinderung der nukleären Translokation als auch der Blockierung des  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplexes als Antagonist des PPAR $\delta$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*) Signalwegs [62].

XAV939 wurde als ein Wnt-Inhibitor entdeckt, der indirekt durch die Stabilisation von Axin im *destruction complex* wirkt. Genauer inhibiert er Tankyrasen, welche wiederum die Axin-Degradation regulieren [58]. In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass sein Einsatz den Wnt Signalweg in CRC Zellen unterbricht [68].

Seit inzwischen fast zehn Jahren ist bekannt, dass die Verbindung PKF118-310 die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den Tcf4-Komplex unterbindet [69]. In weiteren Studien wurde außerdem gezeigt, dass sie in Leberkarzinomen zytotoxisch wirkt, jedoch in normalen Hepatocyten erst bei wesentlich höheren Konzentrationen diesen Effekt hat. Damit wäre die Substanz potentiell für einen Einsatz in der Therapie geeignet; in ersten Studien mit Mäusen ist allerdings die Zytotoxizität zu hoch [70].

In den letzten Jahren hat sich außerdem ein neuer Ansatz als Therapiemöglichkeit entwickelt: Die Hyperaktivierung des Wnt-Signalwegs. In CRC Zelllinien mit sehr hohem  $\beta$ -Cateninlevel wurde eine erhöhte Apoptose im Vergleich zu Zellen mit weniger aktiviertem Wnt-Signalweg gefunden [71]. Erste Versuche beschäftigten sich mit der gleichzeitigen Aktivierung von Wnt und der Zugabe der Inhibition von HDAC-Inhibitoren (siehe Tabelle). In Versuchen mit Mäusen mit konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Catenin wurde festgestellt, dass diese aufgrund erhöhter Apoptose in den Keimzellen zu Infertilität neigen [72]. Weitere Untersuchungen, zum Beispiel durch Transfektionsversuche, haben gezeigt, dass nicht nur eine konstitutive, sondern eine übermäßige Konzentration von  $\beta$ -Catenin im Nukleus dafür verantwortlich ist [73]. Eingedenk dieser Tatsache könnte es damit auch die Suche hin zu hyper-aktivierenden Agenzien fördern.

### 1.3. Zellbasierte Screening-Assays als Methode zur Wirkstofffindung

Seit den 1970er Jahren wird das Konzept der „*target-based drug discovery*“ angewendet, das heißt, pharmazeutische Wirkstofffindung auf der Grundlage einer bekannten Reaktion als in situ-Modellsystem [74]. Hierbei wird in einem biochemischen Assay nach einer Verbindung gesucht, die eine bekannte Enzymreaktion moduliert, was anschließend zum Beispiel colorimetrisch quantifiziert werden kann. Auch klassische DNA-Protein-Bindungsassays folgen dem Prinzip. Die gefundenen Verbindungen werden anschließend als potentielle Wirkstoffe auf Zellen oder Mausmodellen getestet. Durch den technischen Fortschritt in den folgenden zwei Jahrzehnten haben sich enorme, kommerzielle Screening-Plattformen entwickelt, mit denen es möglich ist, täglich bis zu zehntausend Verbindungen durchzutesten – die Geburt des *High-Throughput-Screenings* (HTS). Nachteil des Screenings in definierten, biochemischen Assays ist die Vernachlässigung des zellulären Kontextes: positive Treffer im Assay haben häufig eine ganz andere, unvorhergesehene Wirkung bei der Applikation auf Zellen [75]. Zudem ist für die Unterscheidung eines „Treffers“ von einem „Selektiven Treffer“ ein weiterer Schritt notwendig [76]. Die logische Schlussfolgerung auf dieses Problem war die Etablierung zellbasierter Screening-Assays mittels Reportergenkonstrukten [77]. Heutzutage ist rund die Hälfte aller HTS-Assays zellbasiert.

#### 1.3.1. *High-Content Screening*

Mit der fortschreitenden Technologisierung seit Anfang des 21. Jahrhunderts wurde im High-Throughput-Screening eine neue Dimension zugefügt: die bildgestützte, automatisierte Auswertung von Zellassays. Der Vorteil dieser High-Content Screening (HCS) genannten Methode liegt in einer individuellen Beobachtung auf Einzel-Zell-Ebene, während im klassischen HTS-Ansatz ein Signal über das gesamte Well einer Platte erzeugt und gemessen wird [74]. Zudem ist die Abfrage mehrerer Readouts gleichzeitig möglich, wie die Analyse der Zellmorphologie oder -bewegung, Veränderungen der Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzverteilung oder multipler Reporter gene [78]. HCS-Assays ermöglichen somit bereits auf der ersten Ebene der Wirkstofffindung in sogenannten *primary compound screens* die Generierung von komplexen Informationen, sodass die nachfolgende Evaluierung des Wirkstoffs zeitlich drastisch reduziert werden kann. Dabei gilt in der pharmazeutischen Wirkstofffindung die ADMET-Regel: Bestimmung von Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung, Ausscheidung und Toxizität des Stoffes (*absorption, distribution, metabolism, elimination, toxicity* [77]). Die Limitierung im Einsatz von High-Content-Screenings liegt daher vor allem in der Komplexität der erhaltenen Daten, die bioinformatisch ausgewertet werden müssen, und somit in der automatisierten Software. Dabei gilt jedoch: Je komplexer die Parameter, umso leichter sind die Daten auch manipulierbar. Auf der anderen Seite werden häufig Krebszelllinien als Grundlage der

Assays genommen, welche nicht exakt das physiologische Verhalten wiedergeben. Die Nutzung von primären Zellen oder Stammzellen in einem Assay wiederum ist zwar möglich, deren Beschaffung jedoch aufwändig. Insgesamt ist diese Technologie jedoch eine vielversprechende Methode sowohl für den Einsatz in pharmazeutischen Screening Assays als auch der grundlegenden Analyse von komplexen Signalwegnetzwerken *in vivo*.

### *1.3.2. Fluoreszenzbasierte Assays*

#### *1.3.2.1. Fluoreszenzmikroskopie*

Die Fähigkeit einer Substanz zu leuchten, wenn sie von einer Lichtquelle angestrahlt wird, heißt Photolumineszenz. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz, bei der die Substanz weiter leuchtet, erfolgt bei der Fluoreszenz kein Nachleuchten nach Abschalten der Lichtquelle. Physikalisch gesehen basiert der Vorgang auf der Anregung eines Moleküls nach Absorption eines Lichtquants einer definierten Wellenlänge. Dabei wird ein Elektron aus seinem Grundzustand ( $S_0$ ) in ein energetisch höher gelegenes Niveau gehoben ( $S_1$ ). Durch die spontane Emission eines Photons größerer Wellenlänge kann das Molekül in seinen Grundzustand zurückkehren [Peter W. Atkins, Julio de Paula: Physikalische Chemie, 4. Auflage, 2006, Wiley-VCH Verlag].

Zum ersten Mal wurde dieses Phänomen 1904 von August Köhler in der Mikroskopie angewendet, und zwar in einem UV-Illuminationsmikroskop mit einer Cadmiumlampe als Lichtquelle. 1929 wurde das erste Fluoreszenzmikroskop wie man es heute kennt von Philipp Ellinger und August Hirt entwickelt, in dem erstmals ein Filter zur Selektion nur eines bestimmten Wellenlängenbereiches verwendet wurde [79]. Zu dieser Zeit wurden hauptsächlich organische Verbindungen mikroskopiert, die einen natürlichen Fluoreszenzübergang besitzen – zum Beispiel in den 1940er Jahren zur Analyse der Autofluoreszenz von Geweben [80], [81]. In Abbildung 3 ist schematisch der Strahlengang in einem modernen Fluoreszenzmikroskop erklärt.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute eine Standardmethode zur Aufklärung zahlreicher Fragestellungen. Neben den konventionellen Lichtmikroskopen ermöglicht die laserbasierte Konfokalmikroskopie oder Weitfeldmethoden wie STED (*stimulated emission depletion*), PALM (*photoactivated localization microscopy*) oder STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) hoch- und supraaufgelöster Bilder bis hin zur Einzelmolekülanalyse durch rasterweises Abtasten der Probe [82], [83], [84]. Die Palette von Fluorophoren wird stetig erweitert; durch weitere Entdeckungen und Modifikationen der fluoreszierenden Proteine steht inzwischen das ganze sichtbare Spektrum bis in den Infrarotbereich an Detektionsmöglichkeiten offen. Durch den technischen Fortschritt ist es außerdem möglich, mehrere Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlicher Wellenlängen gleichzeitig in Assays der Wirkstoffscreenings und –entwicklung einzusetzen [85].

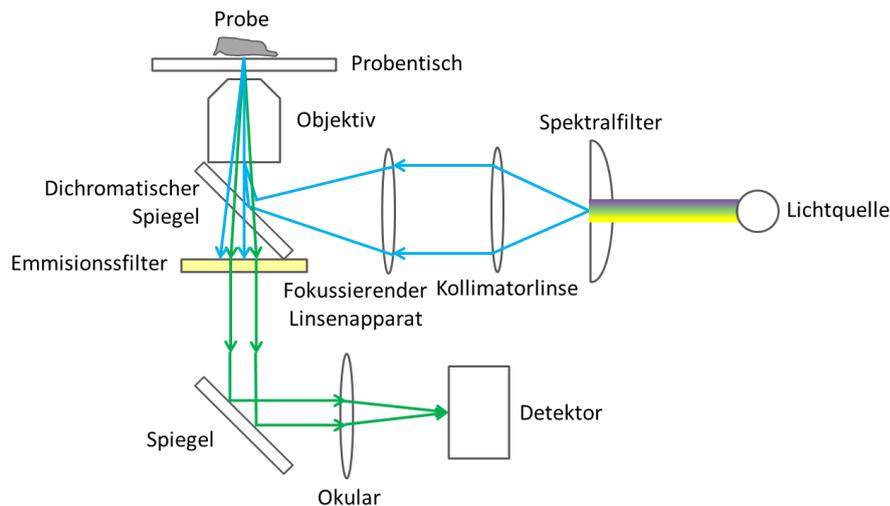


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Fluoreszenzmikroskop. Je nach Aufbau sendet eine Lichtquelle, zum Beispiel eine Quecksilberdampfampe, Licht eines charakteristisches Linienspektrums aus, oder bei Einsatz von LEDs Licht einer definierten Wellenlänge. Durch einen Filter wird vom einfallenden Licht nur ein bestimmter Wellenlängenbereich durchgelassen (z.B. blau, 475 nm). Ein Linsensystem fokussiert den Lichtstrahl auf die zu untersuchende Probe und regt damit den Fluorophor an. Das von der Probe emittierte Licht, hier grün (z.B. 509 nm bei GFP) wird durch einen halbdurchlässigen Spiegel und bildgebender Optik zum Detektor geleitet, was eine Kamera oder das Okular sein kann.

### 1.3.2.2. Das Grün Fluoreszierende Protein GFP

Mit der Entdeckung und Charakterisierung des grün fluoreszierenden Proteins GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* [86] in den 1980er Jahren und dessen ersten Einsatz als Reportergen Anfang der 1990er Jahre [87] kam es zur Revolution der Fluoreszenzmikroskopie mit seinen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, etwa in der Analyse von Gewebeeigenschaften und vor allem in der Verfolgung von Signalwegen innerhalb lebender Zellen. Der Vorteil in der Benutzung von fluoreszierenden Proteinen liegt in deren einfachen Handhabung: die cDNA kann leicht in Vektoren verbaut werden und bei Verwendung von Fusionsproteinen hat GFP meist keine Auswirkungen auf die Faltung des Analyseproteins. Nicht zuletzt dadurch ist GFP ein geeigneter Biosensor und sicherlich einer der Hauptgründe der Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie in seiner heutigen Form.

GFP ist ein 26,9 kDA großes Protein, in dem sich die 238 Aminosäuren in einer tonnenartigen Struktur zusammenfinden [88]. Das photoaktive Zentrum bilden die drei Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67, wobei trotzdem die gesamte Struktur für die Fluoreszenzbildung und seinen Eigenschaften notwendig ist [79]. Aufgrund der Tonnenform ist das aktive Zentrum geschützt, sodass die Fluoreszenz stabil gegenüber äußeren Einflüssen wie Bleaching ist. Das ursprünglich charakterisierte Wildtyp-GFP hat ein Haupt-Anregungsmaximum bei 395 nm und ein Kleineres bei 475 nm, die Emission liegt im hellgrünen Bereich bei 509 nm [88]. Bei hohen Konzentrationen kann GFP dimerisieren, was zu einer erhöhten Photostabilität führt [89].

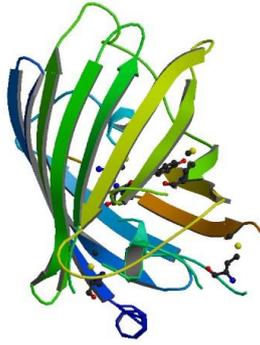


Abbildung 4: Bändermodell der Kristallstruktur des Wildtyp-GFP von Ormö et al, 1996

Die Weiterentwicklung von GFP-Varianten durch optimierte *codon-usage* erlaubt die Handhabung in jedem beliebigen Organismus, sodass sich vor allem in Zellkulturexperimenten und Mausmodellen breite Anwendungsmöglichkeiten bieten. Durch Generierung *photoinstabiler* Varianten wurde der Einsatz in Bleaching-Experimenten erleichtert [78]. Ebenso wurden stabilere Varianten geschaffen, namentlich das *enhanced GFP* (eGFP), die besonders für das Nachverfolgen von Fusionsproteinen geeignet sind [90], [91].

### 1.3.2.3. Fluoreszenzbasierte Testsysteme als Mittel zur Wirkstofffindung

Zellbasierte Assays umfassen eine Vielzahl an Methoden, über welche dieses Kapitel einen kurzen Überblick geben soll. Grundlage dieser Einzelmethoden ist jeweils die Nutzung eines Reportergenkonstrukts, in dem die cDNA des Fluorophors oder Teile davon unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt oder mit einem Zielprotein fusioniert werden. Nach Transfektion in das Zellmodell beginnt die eigentliche Analyse.

Die einfachste Ausführung ist die Messung der Reportergenaktivität in einem fluoreszenzfähigen Plattenphotometer. Wird der Reporter unter einem bestimmten Promotor exprimiert, kann aus dem Signal eine schlichte Ein/Aus-Information gewonnen werden – bei Verwendung mehrerer Farben ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Reporter gegeben. Bei komplexeren Studien empfiehlt sich das Imaging des Reporters in den Zellen mittels High-Content-Screening wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Aber auch das Imaging dicker Gewebe in Mausmodellen ist in der Entwicklung [92]. Dabei wird starkes Licht pulsierend aus mehreren Richtungen auf das Objekt gelenkt und das daraufhin emittierte Licht dreidimensional eingefangen. Dadurch entsteht eine Art Fluoreszenz-Tomogramm.

Die am häufigsten und längsten genutzte Methode im Hochdurchsatzverfahren ist die Durchflusszytometrie, genauer Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation (FACS). Hierbei werden die Zellen einzeln und in hoher Geschwindigkeit durch einen Laserstrahl geleitet; durch die Streuung des Lichts und die resultierende Fluoreszenz kann Aufschluss über Größe, Zelltyp und Reportergenaktivität erhalten werden. Wie der Name impliziert, können mit einem zusätzlichen Modul Zellen aus einem heterogenen Pool nicht nur gemessen, sondern auch sortiert werden, sodass Positive direkt in weiteren Schritten verwendet werden können [93]. Die FACS-Analyse ist eine Standardmethode, um schnell einen Zellpool durchzumessen, dabei ist auch die gleichzeitige Analyse mehrerer Fluorophore möglich. Vor allem Zellzyklusstudien werden häufig mittels FACS durchgeführt, wobei allerdings eine

exakte Trennung zwischen verschiedenen Stadien, beispielsweise späte G1-Phase von früher S-Phase, häufig kompliziert ist. Außerdem wird eine enorme Zahl an Zellen benötigt, um eine statistisch signifikante Aussage zu ermöglichen [94].

Für Proteininteraktionsstudien oder Detektion von Konformationsänderungen eines Proteins z.B. durch Phosphorylierungen wird oft der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) genutzt. Dieser basiert auf der Absorption von Energie eines Fluorophors, dem Energiedonor, und deren Abgabe auf ein in der Nähe befindliches Akzeptormolekül. Durch diese Energieübertragung wird wiederum das Akzeptormolekül zur Fluoreszenz angeregt [95]. Eine gängige Paarung ist zum Beispiel die Paarung von CFP mit YFP (Cyan- und Gelbes Fluoreszierendes Protein), die auch im HTS-Format eingesetzt wird [96][75]. Eine ähnliche Methode nennt sich FLIM: *fluorescence lifetime imaging microscopy*. Hierbei wird die Veränderung der „Fluoreszenzlebenszeit“ des Donors gemessen, die beim Energietransfer eintritt. Die Fluoreszenzlebenszeit ist die durchschnittliche Zeit eines Fluorophors im angeregten Zustand, die an die Photonenemission gekoppelt ist [95]. Diese Detektionsweise ist wesentlich sensitiver als die intensitätsbasierte Detektion des FRET.

#### 1.3.2.4. *Fluoreszenzausbleichverfahren*

Photobleaching bezeichnet den „irreversiblen Verlust der Fluoreszenz infolge des Belichtens des Fluorophors durch eine anregende Lichtquelle“ [89]. Das photoaktive Zentrum wird zerstört und kann keinen Anregungs- / Emissionszyklus mehr durchlaufen. Dieser Zyklus kann in einem normalen Fluorophor millionenfach im Nanosekundenbereich ablaufen. Neben diesem Zyklus ist, mit einer entsprechend minimalen Wahrscheinlichkeit, ein zweiter Prozess der Abregung aus dem angeregten Zustand möglich: das Intersystem Crossing, nach welchem das Molekül in seinem Triplett-Zustand gefangen ist. Durch den Übergang von Sauerstoff von seinem Triplett- in den Singulettzustand wird der Fluorophor wieder in seinen Grundzustand gebracht. Der entstandene Singulett-Sauerstoff ist hochreaktiv (bezeichnet auch als reaktive Sauerstoffspezies ROS), was eine Oxidation des Fluorophors und damit dessen Inaktivierung zur Folge hat (siehe Abbildung 5). Viele Fluorophore besitzen durch diese Generation von ROS daher eine natürliche Phototoxizität. Die Stärke des Bleichens, d.h. wie viele Photonen zur Zerstörung der Fluoreszenz notwendig sind, ist von der Struktur des Fluorophors abhängig [79]. Dies ist ein allgemeines Problem beim Arbeiten mit lebenden Zellen unter fluoreszenzmikroskopischen Bedingungen und erfordert eine hinreichende Balance zwischen Dauer der Exposition zur Signaldetektion und Bleaching [89]. GFP ist ein beliebter Fluoreszenzfarbstoff, da vor allem die optimierten Formen sehr photostabil bei schwacher Belichtung und gering phototoxisch sind. Gleichzeitig ist bei Methoden, die ein kontrolliertes Ausbleichen wünschen, eine ortsspezifische Anwendung möglich. In den folgenden Absätzen werden die gängigsten Methoden beschrieben, in denen Photobleaching als Messmethode angewendet wird.

Durch schrittweises Ausbleichen der Fluoreszenz in einem Bereich (im Folgenden: *region of interest* ROI) ist das quantitative Zählen einzelner fluoreszierender Moleküle möglich. Diese Methode beruht darauf, dass der Verlust der Fluoreszenz stochastisch verläuft – je mehr Moleküle vorhanden sind, umso länger ist die Zeit die benötigt wird, bis das Fluoreszenzsignal zum Hintergrundsignal wird [89], [98]. Da diese Methode allerdings ungenau wird, sobald sich zu viele Fluoreszierende Moleküle in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander aufhalten (aufgrund der FRET, siehe Kapitel 1.3.2.3), kann ohne mathematische Approximationsalgorithmen nur eine geringe Zahl an Molekülen ermittelt werden, etwa bis zu 30 in einer ROI [99].

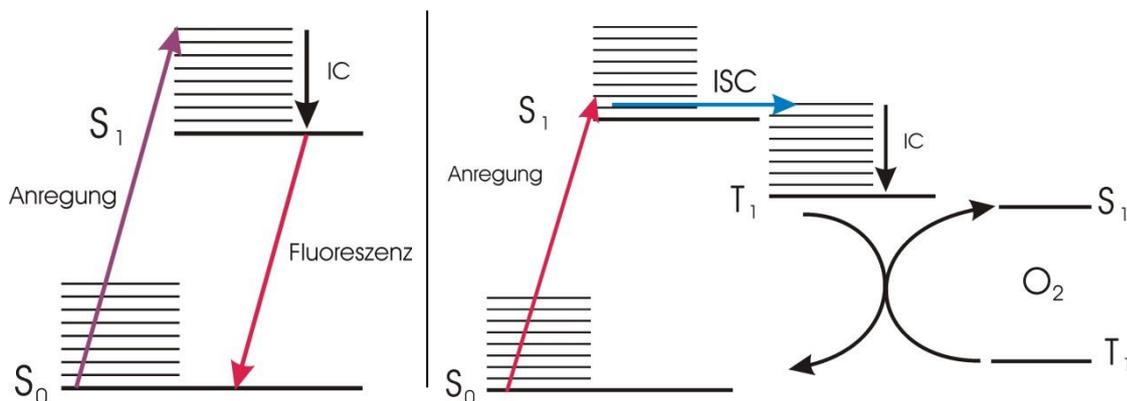


Abbildung 5: Exemplarische Jablonski-Diagramme eines Fluoreszenzprozesses (links) und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während eines Ausbleichvorganges (rechts).  $S_0$  – Singulett (Grund-) Zustand;  $S_1$  - erster angeregter Zustand; IC – Interne Konversion (strahlungsfreie Abregung); ISC – Intersystem Crossing;  $T_1$  – erster angeregter Triplettzustand;  $O_2$  – Sauerstoff. Weitere Erläuterungen im Text. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Felix Kettenbaum, FH Kaiserslautern.

Um die Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen zu bestimmen, wird seit den 1970er Jahren die Zeit und Intensität gemessen, die nach Bleaching eines bestimmten ROIs benötigt wird, um wieder das Level des umgebenden Fluoreszenzsignals anzunehmen. Technisch wird ein hochintensiver, gepulster Laserstrahl auf einen ROI gerichtet, bis dieser ausgebleicht ist [100]. Diese als FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) bezeichnete Methode wurde ursprünglich hauptsächlich für die Geschwindigkeitsbestimmung lateraler Membranbewegungen eingesetzt, wird heute aber vor allem im Live-Cell Imaging angewendet, um den Molekülfluss zwischen einzelnen Kompartimenten nachzuverfolgen [79]. Beispielsweise wurde von Kriehoff et al. der Translokationsmechanismus von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern durch FRAP untersucht und von Jamieson et al. die Lokalisationsdynamik von  $\beta$ -Catenin im Zytosol, Zellkern und der Zellmembran bei unterschiedlichen Aktivierungsstadien des Wnt-Signalweges [30], [101]. Eine andere Anwendung liegt in der Untersuchung von Genexpression-kinetiken: Die Geschwindigkeit, die Transkriptionsfaktoren brauchen, um an ihren Promotor zu binden und wieder ausgetauscht werden, kann durch FRAP deutlich höher zeitaufgelöst werden als beispielsweise durch Chromatinimmunopräzipitation [102]. Eine Abwandlung des FRAP ist das

kontinuierliche Photobleaching, bei dem ein kleiner Punkt in der Zelle dauerhaft belichtet wird, und dabei dessen Fluoreszenzabnahme gemessen wird. Beide Methoden erlauben die Bestimmung von Diffusionskonstanten oder Bindungsparametern [103]. Eine weitere Variante in diesem Zusammenhang ist die bereits in Kapitel 1.3.2.3 erläuterte *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM).

Ähnlich dem kontinuierlichen Photobleaching wird im FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*) ein kleiner Punkt *neben* dem ROI immer wieder belichtet und so eine Recovery verhindert. Dabei wird allerdings nicht, wie oben beschrieben, die benötigte Bleachingzeit gemessen, sondern durch die kontinuierliche Zerstörung weniger Fluorophore kann die Fluidität von Membranen und löslichen Proteinen gemessen werden: Strukturen, die schneller ausbleichen, besitzen eine höhere Beweglichkeit als Immobilisierte, was auf eine Doppelmembran schließen lässt [103]. FLIP wird häufig als zusätzliche Kontrolle in FRAP-Experimenten eingesetzt. [79]

### *1.3.3. Live-Cell Imaging*

Im Live-Cell Imaging erfolgt die Beobachtung von Zellen durch Fotografieren unter dem Mikroskop zu festgelegten Zeitpunkten unter definierten Kulturbedingungen. Gegenstand der Analyse kann dabei die Veränderung von Zellmorphologie, Zellzahl oder Zellposition im Phasenkontrast sein, oder aber auch die Verfolgung eines intrazellulären Signals, beispielsweise eines Reporterproteins mittels Fluoreszenzanregung. In jedem Fall kann die Analyse von Bewegung oder Signalstärke in Echtzeit erfolgen oder Zeitraffer, dadurch können zeitliche Veränderungen quantifiziert und verfolgt, oder ein Reaktionszeitraum überhaupt bestimmt werden. Vorgänge können durch High-Speed-Aufbauten auch erst sichtbar gemacht werden. Durch Einsatz zum Beispiel der in Kapitel 1.3.2 vorgestellten Techniken werden hochauflösende Abbildungen auf zellulärer, sogar auf molekularer Ebene generiert und tragen so zum grundlegenden Verständnis der Vorgänge innerhalb der Zelle bei. Um ein Beispiel zu nennen, der genaue Ablauf der Zellkernteilung in Haarfollikeln konnte ausschließlich durch Einsatz eines zeitaufgelösten Aufbaus aufgeklärt werden [104].

Auf der Suche nach immer besseren Analysemöglichkeiten, die nicht mehr auf die Nutzung von *in-vitro* Modellen angewiesen sind, ist es heutzutage sogar möglich, zeitaufgelöste Studien im ganzen Organismus durchzuführen [104]. Dabei sind transgene Mäuse, die Luciferase-basierte Reporter mit bis zu 90 Farben ins sich tragen, keine Seltenheit [78]. Obwohl die Generierung dieses Modells langwierig und aufwändig ist, können Fehler durch isolierte Zellen ohne ihren Kontext von vornherein ausgeschlossen werden. Nachteilig ist allerdings die reduzierte Auflösung in Tiefenschärfe auf Einzelzellebene.

## 1.4. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist es, auf Basis der verschiedenen, bereits bekannten Arbeiten einen zellulären Assay zu entwickeln, mit dem nach potentiellen Modulatoren des Wnt Signalwegs gesucht werden kann. Dieser Zellassay soll fluoreszenzbasiert und für den Einsatz in Hochdurchsatz-Screeningmethoden oder High-Content-Analysen geeignet sein. Dafür werden im ersten Schritt verschiedene Reportergenkonstrukte generiert und in verschiedenen Zelllinien, darunter Krebszelllinien, transfiziert. Anschließend werden stabile Zelllinien hergestellt, in denen fluoreszenzmikroskopisch die Aktivität des Wnt-Signalwegs abgebildet werden kann. Diese Aktivität wird durch den Einsatz bekannter Modulatoren des Wnt-Signalweges verifiziert. Im dritten Teil werden die neu generierten Zellen auf ein Testsystem adaptiert; dabei wird die Eignung bei Einsatz in einem Screening bis zum 96-Well-Format geprüft. Alle Tests werden bis zu einem Proof-of-Principle durchgeführt.

## 2. Methoden

### 2.1. *Arbeiten mit Bakterien und Nukleinsäuren*

#### 2.1.1. *Transformation von Bakterien*

Ein 50 µl-Aliquot kompetenter Bakterien des Stammes DH5α wurden auf Eis aufgetaut. Zu dem Ansatz wurden etwa 100 ng DNA gegeben und vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C, anschließend noch einmal 5 min auf Eis. Zu dem Ansatz wurden 950 µl raumtemperiertes S.O.C.-Medium gegeben und eine Stunde bei 37 °C im Inkubator geschüttelt. Zum Aussäen der Zellen werden je 100 µl sowohl unverdünnt als auch in verschiedenen Verdünnungsstufen (in LB-Medium) auf LB Agar Platten mit Selektionsantibiotika ausplattiert und mindestens 8 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### 2.1.2. *Maxi-Präparation von bakterieller Plasmid-DNA*

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-Preparation Kits. Fünfzig oder 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm schütteln lassen. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag in je zwei 50 ml-Falcons gefüllt und 15 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert, der Überstand danach verworfen. Die weitere Behandlung der Pellets erfolgte nach dem Qiagen Plasmid Midi Prep Kit Protocol. Das erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde anschließend in 100 µl destilliertem Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurden 2 µl Plasmid-DNA mit 2 µl 10x-Probenpuffer (Invitrogen Blue Juice) vermischt, mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und anschließend im 1 %igen Agarosegel analysiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop Photometers gemessen.

#### 2.1.3. *Restriktionsspaltung von DNA*

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen für eine Klonierung erfolgte in einem 50 µl Ansatz. Dafür wurden 5 µl des 10x Enzyme Reaction Buffers, jeweils 2 Units des Restriktionsenzym (dieselbe Menge bei gleichzeitiger Reaktion mit zwei Enzymen) und mindestens 3 µg der zu spaltenden DNA vermischt und mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei normalen Enzymen eine Stunde, bei High Fidelity Enzymen 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Je nach Enzym erfolgte nach der Restriktion noch eine Abstoppreaktion für 10 min bei 65°C. Vektoren wurden nach der Restriktion mit Phosphatase versetzt, um eine spontane Selbst-Religierung zu unterbinden. Dazu wird zum Restriktionsansatz 1 µl CIP (Calf-intestine phosphatase) und der entsprechende 10x Buffer gegeben (CIP schneidet auch im Restriktionsbuffer).

Zur Überprüfung von Reinheit oder Klonierungserfolg wurde eine Testrestriktion vorgenommen. Diese erfolgte in einem kleineren 20 µl-Ansatz, wobei nur maximal 0,5 µg der zu untersuchenden DNA, 2 µl des Reaktionspuffers und 0,5 Units Enzym eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit wurde auf eine halbe Stunde verkürzt, bei High-Fidelity Enzymen 5 min. Auf eine Abstoppreaktion wurde hier verzichtet.

Die Auswertung der Restriktion erfolgte im 1 %igen Agarosegel; auf 25 ml Agarose 0,5 µl DNA-Farbstoff „GelStar“. Bei präparativen Ansätzen wurden nur 2 µl, bei Testrestriktionen der gesamte Ansatz eingesetzt.

#### *2.1.4. Gelelution*

Zur Aufreinigung von DNA aus Restriktionsansätzen wurde dieser mit 10x Probenpuffer vermischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel in präparative Taschen aufgetragen. Nach Kontrolle der DNA-Fragmente im UV-Licht wurde die gewünschte Bande mit einem feinen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Reinigung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Im letzten Schritt wurde die DNA mit 20-40 µl A.dest von der Säule gewaschen und bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

#### *2.1.5. Ligation geschnittener DNA*

Die Ligation geschnittener DNA-Stücke erfolgte anschließend auf eine Restriktion, sofern die überhängenden Enden kompatibel waren. Verwendet wurde eine T4-Ligase der Fa. New England Biolabs. In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 1 ml der Ligase mit 2 µl des entsprechenden Reaktionspuffers und 100 fmol des geschnittenen, aufgereinigten Vektors mit 300 fmol des ebenfalls geschnittenen und aufgereinigten Inserts vermischt und mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes für die Transformation in Bakterien eingesetzt.

Für die äquimolare Bestimmung der DNA-Molekülmenge aus dem Molekulargewicht wurde folgende näherungsweise Umrechnung benutzt: 1 µg einer 1000 bp langen DNA entsprechen 1,52 pmol.

Eine exakte Umrechnung erfolgte durch die Formel:

$$\text{pmol DNA} = \mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1}{N}$$

Dabei ist N die Zahl der Nukleotide und 660 pg/pmol das durchschnittliche Molekulargewicht eines Nukleotidpaares. Formel entnommen aus dem Online-Tool von Promega: <http://www.promega.com/biomath/calc01.htm>

### 2.1.6. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um spezifische Abschnitte der Matrix-DNA zu vervielfältigen. Dafür wird die Matrizen-DNA zusammen mit spezifischen Oligonukleotid-Primern und einer DNA-Polymerase vermischt und in drei Schritten verdoppelt. Dieser Vorgang wird in mehreren Zyklen durchgeführt.

### 2.1.7. Test-PCR

Die Test-PCR wurde verwendet, um den Klonierungserfolg nach der Transformation in *E. coli* (colony-PCR) oder die Funktion einer Matrix-DNA auf ein PCR-Programm zu überprüfen. Als Ausgangsmaterial wurde im ersten Fall eine Bakterienkolonie in Wasser oder die aufgereinigte Matrizen-DNA verwendet. Als Polymerase wurde der 2x MyTaq Red Mix nach Herstellerangaben im 20 µl-Ansatz verwendet. Das verwendete PCR-Programm TAQTEST ist in Tabelle 3 aufgeschlüsselt.

#### 2.1.7.1. Gradienten-PCR

Zur Feststellung des Temperaturoptimums bei Verwendung eines neuen Primerpaares mit einer Matrizen-DNA wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dabei wurde über den Block des PCR-Gerätes während des Annealings ein Temperaturgradient von 10 °C um das errechnete Optimum angelegt. Pro Temperaturschritt wurde ein 10 µl-Aliquot des Reaktionsansatzes eingesetzt. Für die Gradienten-PCR wurde wie auch für die Test-PCR der Reaktionsmix 2x MyTaq Red Mix verwendet. Als PCR-Programm wurde TAQGRAD verwendet.

#### 2.1.7.2. Präparative PCR

Bei Klonierungsarbeiten, bei denen eine Proofreading-Funktion der Polymerase notwendig war, wurde die Polymerase Phusion nach Herstellerangaben in einem 50 µl-Ansatz verwendet. Darin wurden 500 ng der Ausgangs-DNA mit den spezifischen Primern eingesetzt. Das Temperaturoptimum der Primerpaare wurde jeweils einzeln bestimmt, die Annealing-Temperatur in Tabelle 3 stellt daher ein Beispiel für das Programm PHUSION dar.

PCR-Programm:	TAQTEST		TAQGRAD		PHUSION	
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	94°C	2min	98 °C	1 min
Denaturierung	94°C	30 s	94°C	30 s	98 °C	20 s
Annealing	60°C	30 s	20x 55-65°C	30 s	60 °C	90 s
Elongation	72°C	1 min	72°C	1 min		
Finale Elongation	72°C	3 min	72°C	3 min	72 °C	70 s

Tabelle 3: Aufschlüsselung der einzelnen verwendeten PCR-Programme in ihre Teilschritte

### *2.1.8. Klonierungsarbeiten*

Alle Klonierungsarbeiten wurden mit der Polymerase Phusion durchgeführt, die verwendeten Restriktionsenzyme werden im Einzelnen erwähnt. Test- und colony-PCRs wurden mit MyTaqRedMix durchgeführt. Der Ablauf der einzelnen Klonierungsschritte erfolgte nach dem standardisierten Protokoll:

Im 20µl-Ansatz wurden die isolierte, geschnittene Sequenz und Ziel-Plasmid-DNA mit T4-Ligase ligiert. Fünf Mikroliter des Ligationsansatzes wurden vor der Transformation auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen und so der Ligationserfolg überprüft. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente DH5α Zellen des Typs NEB10β nach Angaben des Herstellers mit max. 2 µl des Ligationsansatzes. Die Transformanten wurden auf Agarplatten mit Antibiotika (100 mg/ml Ampicillin) kultiviert.

Nach einer mindestens 8-stündigen Inkubation bei 37°C wurden von jedem Klon Kolonien gepickt, davon je eine Vorkultur angeimpft und colony-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer entsprachen den Primern für die präparative PCR, sofern nicht anders erwähnt.

Von den positiven Klonen wurde jeweils eine Plasmidpräparation in 5 ml TB-Medium angefertigt. Auf die erhaltene DNA wurde ein Testrestriktionsverdau durchgeführt und bei einem positiven Ergebnis sequenziert.

#### *2.1.8.1. Klonierungen mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit*

Das Prinzip des QIAGEN PCR Cloning Kits besteht darin, dass jede non-proofreading Polymerase (z.B. Taq) automatisch bei jeder Reaktion einen Adenin-Überhang generiert. Das Kit enthält einen linearen Vektor mit Uracil-Überhang, an den das PCR-Produkt hybridisiert und sich leicht ligieren und transformieren lässt. Der Vektor enthält bereits mehrere Restriktionsschnittstellen und zwei Resistenzgene und stellt so einen Klonierungszwischenvektor da, aus dem die zu klonierende Sequenz leicht per Restriktionsverdau herausgeholt werden kann.

Im ersten Schritt wurde durch PCR die zu klonierende Sequenz hergestellt. Hierfür wurde entweder die RedTaq oder bei langen Templates eine Mischung aus Phusion und Taq verwendet. Das PCR-Produkt wird durch Säulenaufreinigung mit gängigen Kits aufgereinigt und sofort in den mitgelieferten Zielvektor ligiert. 2 µl des Ligationsansatzes werden sofort in QIAGEN EZ Zellen transformiert und wurden direkt ausplattiert.

#### *2.1.8.2. Klonierung der Vektoren pDisplay-ΔTop-EGFP3a*

Um die Aktivität des Wnt Signalwegs sichtbar zu machen, wurde ein Reportergenkonstrukt entwickelt, der unter der Promotorkontrolle des Wnt Signalwegs steht. Ausgehend von der Arbeit

von [105] wurde das TCF Bindemotiv (genannt TOP-Sequenz = *TCF Optimal Binding Sequence*) mehrfach hintereinander geschaltet und mit der Sequenz eines fluoreszierenden Proteins gekoppelt (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP) und das Zielkonstrukt pDisplay-ΔTop-EGFP3a (im folgenden pDis-ΔTop3a) genannt. Die entsprechende, mutierte Negativsequenz, an der TCF nicht binden kann, wurde analog dazu als FOP-Sequenz bzw. pDisplay-ΔFop-EGFP (pDis-ΔFop).

Die Klonierung der Vektoren pDis-ΔTop3a und der entsprechenden Negativ-Kontrolle pDisplay-ΔFop-EGFP erfolgte schrittweise aus den von Dr. Sonja Eberth (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellten Vektoren pDisplay-EGFP und pDisplay-ΔTop bzw. pDisplay-ΔFop. Im ersten Schritt wurden die beiden Templates mit SfiI geschnitten; pDisplay-EGFP wurde zusätzlich mit dem Enzym XmaI verdaut. Die gewünschten DNA-Teilstücke wurden durch Agarosegel-Aufreinigung erhalten und durch Ligation miteinander rekombiniert; der Ansatz in E.coli wie beschrieben transformiert. Der Erfolg der Klonierung erfolgte zum einen durch Test-PCR mit dem Primerpaar pDisplay\_for/pDisplay\_rev und zum anderen durch Sequenzierung der relevanten Sequenz durch LGC Genomics.

#### 2.1.8.3. *Klonierung der Vektoren pDisplay-SuperTop-EGFP und pDisplay-SuperFop-EGFP*

Um die Anbindung an das TCF Bindemotiv zu verbessern und somit die WNT Signalwegantwort zu verstärken wurden die vorhandenen TOP-Motive im pDisplay-ΔTop3a-EGFP Vektor verdoppelt auf sechs Bindemotive. Hierfür wurden per PCR die TOP bzw. FOP Motive vervielfältigt und dabei flankierende SacI Bindestellen erzeugt. Durch Gelaufreinigung wurde das entstandene etwa 100 bp lange PCR Produkt isoliert und anschließend mit SacI-HF verdaut. Das resultierende 70 bp Endprodukt wurde aus einem 3 %igen Agarosegel isoliert und durch eine Flüssigsäule aufgereinigt.

Als Zielvektor dient der mit SacI geschnittene und mit CIP (Calf Intestine Phosphatase) behandelte Ausgangsvektor.

#### 2.1.8.4. *Klonierung der Vektoren pDisplay-SuperTop-EGFPneu4*

Um die in den pDisplay-Vektoren enthaltene Verankerungssequenz *Igk-chain leader sequence* zu entfernen, wurde der Vektor durch Einsatz der Restriktionsenzyme BamHI und BglII verkürzt. Die Verwendung dieses Enzymepaares resultierte in der Entstehung kompatibler Enden, sodass nach Restriktionsverdau das au gereinigte Produkt wieder direkt ligiert und transformiert werden konnte

#### 2.1.8.5. *Klonierung der Expressionsvektoren pβcat-mCherry und pΔTop-βcat-mCherry*

Um die Molekülbewegungen von β-catenin und dessen Konzentrationsänderungen in der lebenden Zelle direkt nachverfolgen zu können, wurde ein Vektor erstellt, in dem β-Catenin an das rot

fluoreszierende Protein mCherry gekoppelt ist. Im ersten Schritt wurde  $\beta$ -catenin-mCherry unter der Kontrolle des konstitutiven Promoters CMV geschaltet, im nächsten Schritt wurde dieser durch drei TOP-Motive ausgetauscht, um einen physiologischeren Promotor zu erhalten.

Hierfür wurde per PCR die Sequenz des  $\beta$ -Catenins aus dem Vektor pQE32- $\beta$ -catWT isoliert und vervielfältigt. Die Primer fügen zum 5'-Ende der Sequenz eine SacI und am 3'-Ende eine XmaI-Schnittstelle ein. Durch Gelaufreinigung wurde das entstandene etwa 2,5 kbp große PCR Produkt isoliert. Sowohl der Zielvektor pmCherry als auch das PCR Produkt wurden zuerst mit Sall-HF und anschließend mit XmaI-HF geschnitten und über eine Säule aufgereinigt. Zusätzlich wurde der Zielvektor anschließend mit CIP behandelt. Anschließend erfolgte eine Ligation und die Transformation in *E. coli*. Die Transformanten wurden auf Agarplatten mit Antibiotika (50 mg/ml Kanamycin) bei 37°C kultiviert. Nach einer mindestens 8-stündigen Inkubation wurden von jedem Klon Kolonien gepickt, davon je eine Vorkultur angeimpft und colony-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer setzen mitten im  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -cat\_for1) und am Ende ( $\beta$ -cat-XmaI\_rev2) ergaben ein PCR-Produkt von 1,7 kbp.

Von den positiven Klonen wurde jeweils eine Plasmidpräparation in 5 ml TB Medium angefertigt. Auf die erhaltene DNA wurde ein Testrestriktionsverdau durchgeführt und bei einem positiven Ergebnis sequenziert (LGC Genomics / GATC Biotech AG).

#### *2.1.8.6. Klonierung der Expressionsvektoren pBcatenin-EGFP und pBcatenin-SNAP*

Als ersten Schritt der Klonierung des Vektors pBcatenin-EGFP wurden die notwendigen DNA-Teilstücke durch Restriktionsverdau aus dem Ausgangsvektor pBcatenin-mCherry mit den Enzymen BamHI und NotI und dem Vektor pDisplay-eGFP mit BglII und NotI erstellt. Nach dieser Umklonierung wurde durch eine kombinierte Mutagenese-Overlap-Extension-PCR ( $\beta$ cat-eGFP-NotI\_rev / bcat\_EcoRV\_for / bcat\_EGFP\_for / bcat\_EGFP\_for) das Leseraster zwischen  $\beta$ Catenin und eGFP wieder korrekt hergestellt.

Im ersten Schritt zur Herstellung des Reportergergenkonstrukte pBcatenin-SNAP wurden die Ausgangsvektoren pSNAPf und pBcatenin-mCherry mit den Enzymen NotI und AgeI geschnitten, pBcatenin-mCherry wurde anschließend zusätzlich mit alkaliner Phosphatase behandelt. Nach der Aufreinigung der gewünschten DNA-Teilstücke aus dem Agarosegel und anschließender Ligation wurde mit Hilfe einer Overlap-Extension-PCR (Snap\_shift\_for / Snap\_shift\_rev / Snap\_end\_rev /  $\beta$ Cat\_for1) das Leseraster zwischen den Einzelsequenzen korrigiert.

## 2.2. *Arbeiten in der Zellkultur*

### 2.2.1. *Kultivierung einer Zelllinie*

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) komplettiert mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA) und 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Eintrag in 25 ml-Kulturflaschen kultiviert. Für die Subkultivierung wurde im ersten Schritt das Medium über den Zellen vollständig entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS-Puffer. Anschließend wurden diese mit 2 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 ml vollständigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit über dem resultierenden Zellpellet wurde vollständig abgesaugt, das Pellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Zehntel der Suspension wurde in eine neue Kulturflasche mit 5 ml Medium überführt.

### 2.2.2. *Zellzahlbestimmung und Vitaltest*

Das Zählen der Zellen erfolgte während der Subkultivierung (Trypsinieren) nach dem Resuspendieren des Zellpellets. Ein Teil der Zellsuspension wurde zum gleichen Teil mit 0,5 %iger Trypanblau-Lösung gemischt, davon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Das Zählen der lebenden Zellen erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop. Blaugefärbte Zellen wurden nicht gezählt. Die Berechnung der Zellzahl in einem Milliliter Suspension erfolgte durch Multiplikation des Mittelwerts in den vier Großquadranten mit dem Wert  $2 \times 10^4$ . Bei Bestimmung des Verhältnisses von lebenden Zellen zu toten Zellen wurden sowohl gefärbte (tote) als auch ungefärbte (lebende) Zellen gezählt.

### 2.2.3. *Kryokonservierung von Zellen*

Zur Kryokonservierung von Zelllinien wurden diese in 125 ml-Kulturflaschen bis zu einer optischen Konfluenz von ca. 70 % wachsen lassen. Anschließend wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.2.1 subkultiviert und das Zellpellet in kaltem Einfriermedium (DMEM komplett versetzt mit 10 % DMSO) resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde gezählt, daraufhin wurde die Zelldichte auf  $10^6$ - $10^7$  Zellen pro ml eingestellt und in Kryoröhrchen verteilt. Diese Aliquots wurden im Einfriergerät im Gefrierschrank bei -80 °C zwei Tage eingefroren und anschließend in den Stickstoffcontainer für die langfristige Lagerung überführt.

Um Zellen aus der Kryokonservierung wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Zellröhrchen aus dem Stickstoffcontainer entnommen und im Wasserbad bei 37°C für 5 min aufgetaut. Anschließend wurde das Röhrchen für 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das alte Medium vollständig entfernt und das Zellpellet in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert. Die

gesamte Zellsuspension wurde in eine neue, sterile 25 ml-Kulturflasche in 5 ml Medium überführt und bei 17 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Eintrag kultiviert.

#### *2.2.4. Transfektion von Zellen*

Die Transfektion der Zelllinien HEKB und HEK293T erfolgte mit dem Lipofektionsreagens Roti®Fect nach Herstellerangaben im 24-Well-Format. Eingesetzt wurde pro Well 0,5 µg Plasmid-DNA.

Die Transfektion der Zelllinie HEK293 und SW480 erfolgte mit dem Reagens Roti®Fect Plus nach Herstellerangaben im 24-Well-Format. Eingesetzt wurde pro Well 0,5 µg Plasmid-DNA.

Die Transfektion von MDCK-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagens Metafectene Easy nach Herstellerangaben im 24-Well-Format. Eingesetzt wurde 0,25 µg Plasmid-DNA pro Well.

Stabile Transfektionen wurden im 6-Well-Format mit je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well durchgeführt und die Menge der Reagenzien entsprechend hochskaliert. Nach 14 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kompletmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde dem Medium Geneticin in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugefügt. Die Kultivierung mit diesem Selektionsmarker erfolgte so lange, bis die mitgeführte, transfektionslose Kontrolle vollständig abgetötet wurde. Die selektierten Kolonien wurden durch Picken unter dem Mikroskop Olympus IX50 vereinzelt und bis zu ihrer Charakterisierung in Kompletmedium, ergänzt durch 0,5 mg/ml Geneticin, kultiviert.

#### *2.2.5. Zelluläre Assays*

Als zelluläre Assays werden im Folgenden alle standardisierten Tests bezeichnet, in denen Zellen im 24- oder 96-Well-Platten-Format auf ihre Reaktion unter verschiedenen Bedingungen beobachtet und diese anschließend quantifiziert wurden. Alle Assays wurden in drei unabhängigen Durchläufen ausgewertet.

##### *2.2.5.1. Zellassays zur Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen*

Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen durch eGFP-Expression wurden die Zellen jeweils in Triplikaten in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in eine fluoreszenzgeeignete 96-Well-Platte ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank kultiviert. Die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgte mit einem Medienwechsel, wobei in 100 µl pro Well die Substanzen phenolrotfreiem DMEM komplettiert mit 10 % FCS und 1 % P/S gelöst waren. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt direkt nach dem Medienwechsel, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden. Dabei wurde ein Plattenphotometer mit einem Anregungsfilter von 480 nm und einem

Emissionsfilter von 520 nm verwendet. Als interne Kontrollen wurde jeweils ein Blank ohne Zellen und unbehandelte Zellen auf der gemessenen Platte mitgeführt.

Diese Art des Zellassays wurde für den kompetitiven Assay mit HEK293-STEne4 A2/A3-Zellen und den Aktivierungsassays mit HEKB- $\Delta$ Top3a F10 und HEKT-STE4-1-5 1C Zellen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie HEKT-EGFPA1 und als Negativ-Kontrolle HEK293 Zellen eingesetzt.

#### *2.2.5.2. WST-1 Zellvitalitäts- und Proliferationstest für adhärenente Zellen*

Der WST-1 Assay dient dem Ermitteln der Zahl lebender Zellen und wurde in einer 96-Well-Platte nach der Beendigung des Fluoreszenzassays durchgeführt. Pro Well wurden 5  $\mu$ l des unverdünnten WST-1-Reagenzes zugegeben und die Platte anschließend für 2,5 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Reagenz in die Verbindung Formazan umgesetzt, die als gelbe Färbung zu erkennen war. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 445 nm gegen 620 nm im Plattenphotometer gemessen. Für die Quantifizierung wurde zuvor eine Referenzplatte derselben verwendeten Zelllinie mit mindestens fünf definierten Zellkonzentrationen in Triplikaten angefertigt und so die exakte Zellzahl im Assay errechnet.

#### *2.2.6. Nachverfolgung von $\beta$ -Catenin bei Wnt-Signalwegsänderungen*

Für die Nachverfolgung von  $\beta$ -Catenin wurden HEKB oder HEK293 Zellen, transfiziert mit einem der Vektoren pBCatenin-EGFP, pBCatenin-mCherry, pBCatenin-SNAP, in 24-Well-Platten ausgesät und mit einem Wnt-modulierendem Reagenz behandelt: 2 mM ASS, 5 mM LiCl, 20  $\mu$ M XAV939. Die Fluoreszenz wurde unter dem Mikroskop Olympus IX50 direkt nach Zugabe, nach 10, 20, 30, 60, 120, 240 min und nach 24 Stunden beobachtet und protokolliert.

#### *2.2.7. Untersuchung von Morphologieänderungen in MDCK-Zellen*

Für die Untersuchung von Wnt-Signalwegsabhängigen Morphologieänderungen in MDCK-Zellen wurden die jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen der Zelllinien MDCK, MDCK- $\beta$ cat-mcherry, MDCK-F3 und MDCK-craf-mCherry in die Wells einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Mit diesem wurden die Zellen entweder mit 5 mM ASS oder mit 10 mM LiCl behandelt. Die Beobachtung der Zellgestalt und gegebenenfalls der Fluoreszenz wurde am Mikroskop Olympus IC50 sofort nach dem Medienwechsel und danach nach 4 h, 24 h, 48 h und einer Woche vorgenommen. Im Verlaufe des Experiments wurde alle drei Tage das Medium, ergänzt durch entweder LiCl oder ASS, in der Platte gewechselt.

### *2.2.8. Sortieren von Wnt-aktivierten Zellen mit Hilfe von magnetisch markierten Antikörpern*

Vor Versuchsbeginn wurden HEKT-STE4-1-5 1C Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät, um die Reaktion dieser Zelllinie auf verschiedene Konzentrationen an LiCl oder Wnt3a zu testen. Dafür wurden nach einer Wachstumszeit von 48 Stunden jeweils 0,1 M, 1 mM oder 10 mM LiCl beziehungsweise 20 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml Wnt3a mit einem Medienwechsel auf die Zellen appliziert. Die Beobachtung und Protokollierung der Fluoreszenzentwicklung erfolgte alle 24 Stunden am Zeiss Observer.Z1.

HEKT-STE4-1-5 1C, HEKT-EGFPA1 und HEK293 Zellen wurden in 125 ml-Flaschen kultiviert. 24 h vor Versuchsbeginn wurde eine Flasche entweder mit LiCl (5 mM) oder mit Wnt3a (50 ng/ml oder 100 ng/ml) behandelt. Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert, um ihr Fluoreszenzmuster zu protokollieren. Die Zellen wurden mit 5 ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert und nach Resuspension des Zellpellets in 5 ml frischem Medium wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Pro zu sortierender Zellfraktion wurden  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und zu einem Pellet zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in je 80  $\mu$ l MACS Puffer (PBS-Puffer ergänzt durch 1% BSA und 2 mM EDTA) resuspendiert und mit 20  $\mu$ l Anti-GFP Beads gemischt. Die Suspension wurde 25 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert und anschließend 10 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert, um die ungebundenen Beads zu entfernen. In der Zwischenzeit wurden Large Depletion Säulen (LD) in den dafür vorgesehenen Magneten geklinkt und mit je 5 ml MACS Puffer equilibriert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml MACS Puffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Sobald die Säule leergelaufen war, wurde zweimal mit je 3 ml MACS Buffer gewaschen. Um die gebundenen Zellen von der Säule zu waschen, wurde die Säule vom Magneten entfernt, erneut 5 ml MACS Buffer hinzugegeben und mit dem Druckstempel langsam und gleichmäßig die Zellen aus der Säule in ein Sammelgefäß gewaschen. Jede einzelne Fraktion wurde gesammelt, zentrifugiert und anschließend in der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Zellen, die nicht gebunden wurden und die mit magnetischen Antikörpern beladene Fraktion wurden jeweils wieder in 50 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und 72 Stunden nach dem Experiment die Fluoreszenz und Zellvitalität beobachtet.

## 2.3. *Mikroskopische Methoden*

### 2.3.1. *Fluoreszenzmikroskopie*

Während der Experimente erfolgte eine Protokollierung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Für Übersichtsbilder oder qualitative Auswertungen wurde das Olympus IX30 genutzt und die Bilder mit der Analysesoftware Analysis aufgenommen. Das Anregungslicht für die Fluoreszenzen wurde mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe erzeugt und anschließend mit Filtersets für die entsprechende Farbe zu der geeigneten Wellenlänge gefiltert (grün: 470 nm, rot: 620 nm)

Mikroskopische Aufnahmen für die Bildanalyse, Live-Cell Imaging oder bei Benutzung eines 20x-Nahfeldobjektivs wurden mit Hilfe des Zeiss Observer.Z1 und der assoziierten Aufnahme- und Analysesoftware AxioVision aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte in erster Instanz mit der genannten Software und die Weiterverarbeitung der Daten in Excel.

### 2.3.2. *Arbeiten mit dem Mikroskopiesystem Observer.Z1*

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten basierten hauptsächlich auf der Nutzung des Mikroskopiesystems Observer.Z1 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland). Der Vorteil des Systems ist neben der normalen Nutzung als Licht- und Fluoreszenzmikroskop vor allem die Reproduzierbarkeit des Experimentablaufs. Dies wird durch mehrere automatisierte Module ermöglicht: ein computergesteuerter Probentisch hält zu jedem Zeitpunkt die exakte Position fest. Darüber hinaus können dadurch distinkte Positionen festgelegt und automatisch nacheinander angefahren werden. Durch den motorisierten Filterrevolver können verschiedene Filterblöcke vibrationsfrei kurz hintereinander angewendet werden. Mit der aufgebauten Inkubationskammer werden über einen langen Zeitraum sowohl Temperatur als auch CO<sub>2</sub> festgelegt und kontrolliert werden, sodass eine Analyse von lebenden Zellen innerhalb von Kulturbedingungen gegeben sind. Die Übertragung der Aufnahmen erfolgt über eine hochauflösende Schwarz-Weiß-Kamera an die Software. Durch ein weiteres Modul innerhalb der Software ist ein programmierter Ablauf speicherbar, sodass eine Analyse theoretisch komplett automatisiert ablaufen kann. Dies ermöglicht zum einen, dass mehrere Farbkanäle sowohl gleichzeitig als auch getrennt voneinander analysiert werden können.

#### 2.3.2.1. *Mikroskopische Assays*

Als Mikroskopische Assays wurden Testsysteme bezeichnet, die zusätzlich zur Auswertung über ein Plattenphotometer auch unter dem Mikroskop ausgewertet wurden. Dies wurde im kompetitiven Assay von HEK293-STEneu4 A2/A3 Zellen vorgenommen. Dabei wurde ein Bild pro Well zentral aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte über die Software AxioVision. Hierbei wurde jedes Bild mit einem Profilbalken belegt und die Signalstärke als Grauwerte an jedem einzelnen Punkt des

Balkens ausgelesen. Die weitere Prozessierung (Hintergrundbereinigung und graphische Darstellung) der Daten wurde in Microsoft Excel vorgenommen.

### *2.3.2.2. Live-Cell Imaging*

Um Vorgänge innerhalb von Zellen zeitabhängig beobachten zu können, wurden mit dem Observer.Z1 Zellen in einem physiologischen Kultivierungsumfeld über längere Zeiträume mikroskopiert. Die Kultivierungsparameter wurden in der Software AxioVision auf 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub>-Gehalt eingestellt. Bis zu einem Zeitraum über 24 Stunden wurden jeweils die Fluoreszenz nach Anregung bei 470 nm und anschließend der Phasenkontrast des Bildausschnitts im Abstand von 10 min aufgenommen. Um eine größere Zahl an Zellen bei gleicher Auflösung analysieren zu können, wurden jeweils Mosaikbilder zu 2x2 Bildern um das Zentrum ausgewählt.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte über die Software AxioVision. Je nach Bildqualität wurde ein Bereich oder das gesamte Bild markiert. Das mittlere Fluoreszenzsignal des Bereichs wurde von der Software über das Bildprofil zu den jeweiligen Zeitpunkten ausgegeben. Der Abzug des Hintergrundsignals wurde anschließend durch Subtraktion des jeweils niedrigsten Wertes vom Mittelwert pro Zeitpunkt in Microsoft Excel berechnet. So wurde die Entwicklung des Gesamtfluoreszenzsignals über die Zeit verfolgt.

### *2.3.2.3. Bestrahlungsexperimente*

Für die Vorversuche der Bestrahlungen von SW480-STeneu4- und HEKT-EGFPA1-Zellen wurden diese in 4-Kompartiment-Schalen mit Deckglasbodendicke konfluent ausgesät. Nach einer Wachstumszeit von 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch phenolrotfreies Medium, versetzt mit den jeweiligen Inhibitoren ASS, XAV939, PKF118-310 oder FH535, ersetzt. Anschließend wurde unter dem Observer.Z1 nacheinander in jedem Kompartiment eine Fläche von 1,4 mm × 1,4 mm über einen Zeitraum von einer Stunde belichtet. Während dieser Zeit erfolgte im Abstand von 5 Minuten eine Dokumentierung der Zellen aller Kompartimente. Anschließend wurde eine Neubildung des Fluoreszenzsignals (Recovery) über einen Zeitraum von 12 oder 24 Stunden in 10-Minuten-Schritten dokumentiert. Die Auswertung des Fluoreszenzsignals erfolgte über die Software AxioVision. Dabei wurde ein Profilrahmen über das gesamte Bild gelegt. Die Software errechnete automatisch die Gesamtstärke des Fluoreszenzsignals pro Zeitpunkt, indem der Flächeninhalt dieses Rahmens als Mittelwerte der Grauwerte angegeben wurde. Die Hintergrundbereinigung der Daten wurde über Microsoft Excel vorgenommen. In diesen Vorversuchen wurde die minimale Länge der Bestrahlungsdauer und das Verhältnis der Recovery in behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle ermittelt.

Für eine gleichzeitige Bestrahlung von vier Wells wurde ein Strahlungsaufbau entwickelt, der im Brutschrank angewendet werden kann. Er besteht aus vier LEDs, auf die sich eine quadratische 4-

Well-Platte mittig aufsetzen lässt (Abbildung 6). Die LEDs sind austauschbar; die Bestrahlungen wurden initial bei 470 nm über 3 h durchgeführt, dabei wurde jede Stunde die Fluoreszenz am Observer.Z1 protokolliert. Anschließend erfolgten Bestrahlungen bis zu 24 h bei 470 nm und bei 405 nm.

Die Bestrahlungen in 24-Well-Platten wurden in einem Aufbau durchgeführt, in dem eine Platte gleichmäßig mit hoher Intensität ausgeleuchtet werden kann (zur Verfügung gestellt von Dr. Hans-Jochen Foth und Carole Simon, TU Kaiserslautern, siehe Abbildung 7). SW480-STeneu4 Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Bestrahlung konfluent in die Wells der Platte ausgesät und kultiviert. Direkt vor der Bestrahlung wurde das Medium durch phenolrotfreies Medium versetzt mit Inhibitor getauscht. Die Bestrahlung im Bestrahlungsaufbau erfolgte für 10 Minuten bei 405 nm. Vorher und anschließend wurde die Vitalität und Fluoreszenz der Zellen am Observer.Z1 protokolliert. Nach einer Recoveryzeit von 24 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen erneut unter dem Mikroskop aufgenommen.

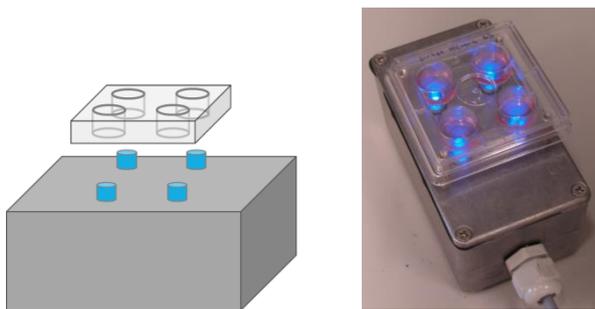


Abbildung 6: Während dieser Arbeit entwickelter Strahlungsaufbau für die Nutzung im Brutschrank.

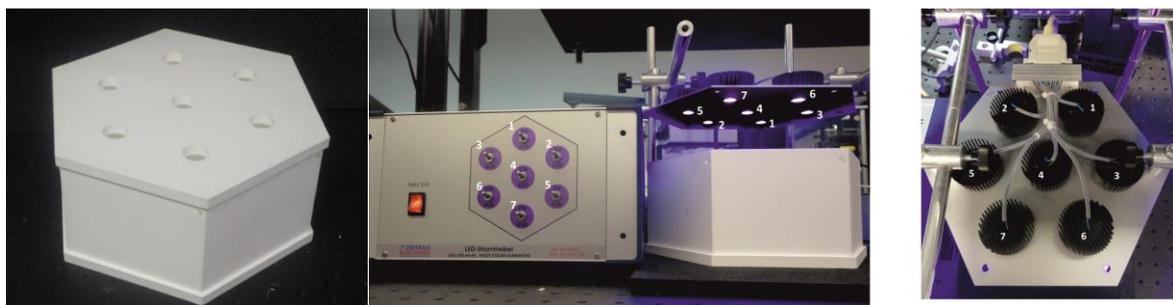


Abbildung 7: Bestrahlungsaufbau bei 405 nm. Links: Der Bestrahlungskasten besteht aus einem Teflon-Hexagon, in dessen Innerem Zellkulturplatten arretiert werden können. Mitte und Rechts: die LEDs sind in einem externen Deckel eingelassen und können einzeln zugeschaltet werden. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Carole Simon, TU Kaiserslautern

## 3. Materialien

### 3.1. Verwendete Geräte und Software

#### 3.1.1. Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>-80°C Tiefgefrierschrank HeraFreeze basic</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Co<sub>2</sub> Inkubator IncuSafe</b>	SANYO Electric Co. Ltd, München, Deutschland
<b>Einfriergerät „Mr. Frosty“</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Detschland
<b>Feinwaage</b>	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
<b>Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50</b>	Olympus Deutschland, Hamburg
<b>Fluorophotometer Genius</b>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<b>Fujifilm LAS3000 Chemilumineszenzdetektor</b>	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
<b>Gefriertruhe exquisit</b>	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, Deutschland
<b>Geldokumentationssystem</b>	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
<b>iBlot 7-Minute Blotting System</b>	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
<b>Inversmikroskop Olympus CKX41</b>	Olympus Deutschland, Hamburg
<b>Kühlschrank exquisit</b>	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, Deutschland
<b>Kühlzentrifuge Z323K</b>	Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland
<b>Mikrowelle exquisit MW1780G</b>	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, Deutschland
<b>Mini u. Midi Elektrophorese Einheit</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>MiniFuge</b>	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Netzgerät</b>	Biorad, München, deutschland
<b>Observer.Z1</b>	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
<b>PCR-Gerät Mastercycler gradient</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>PH-Meter</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Photometer Nanodrop 2000</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Qubit 2,0 Fluorometer</b>	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
<b>Schüttelinkubator Ecotron</b>	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
<b>Sterilbank Biowizard, Zellkultur</b>	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
<b>Sterilbank MSC Advantage, Bakterienkultur</b>	Thermeo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Thermomixblock MB-102</b>	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Tischzentrifuge MiniSpin Plus</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Vortexer Vortex-Genie2</b>	Scientific Industries, New York, USA
<b>Wärmeschrank</b>	Memmert, Schwabach, Deutschland
<b>Zentrifuge C5804</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.1.2. Verwendete Analysesoftware

Produkt	Hersteller
AnalySIS	Olympus SoftImaging, Münster, Deutschland
AxioVision	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Image J	Wayne Rasband, National Institut of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office Professional Pro	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Quantum Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Serial Cloner	Softonic, Barcelona, Spanien

## 3.2. Kits und Chemikalien

### 3.2.1. Kits für die Molekularbiologie

Kit	Firma
Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Hi Yield
MyTaq Red Mix	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Phusion® Flash High-Fidelity PCR-Mix	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Plasmid Mini Prep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Plasmid Purification Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Qiagen PCR Cloning Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SNAP-Cell Starter Kit	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
UltraClone™ Ligation Reaction	Lucigen, Middleton, USA

### 3.2.2. Kits für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
µMAC Anti-GFP Starting Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Peqlab Tissue DNA Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
SNAP-Cell Starter Kit	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Transfektions Kit Roti®-Fect Plus	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Transfektions Kit Roti®-Fect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Transfektions-Kit Metafectene Easy	Biontex Laboratories, Martinsried, Deutschland
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Mannheim, Deutschland

### 3.2.3. Kits für die Proteinanalyse

Produkt	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
iBlot 7-Minute Blotting Kit	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
Novex pH 3-10 IEF Gel 1.0mm, 10Well	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
Qubit 2,0 Quantification Starter Kit	Life Science Technologies GmbH, Darmstadt
RotiLumin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 3.2.4. Puffer und Lösungen

Name	Komponenten	Konzentrationen
BSA-Lösung	BSA in TBS-T	5%
Einfriermedium	FCS	10 %
	Penicillin-Streptomycin	1 %
	DMSO	10 %
LB Medium (nach Luria)	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	Natriumchlorid	0,5 g/l
MACS Puffer	BSA	1 %
	EDTA	2 mM
	In PBS-Puffer	
PBS Puffer	Natriumchlorid	8 g/l
	Kaliumchlorid	0,2 g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat	1,42 g/l
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,27 g/l
Ponceau-S	Ponceau in	0,1%
	Essigsäure	1%
TAE Puffer 500 ml	Tris	121 g
	Essigsäure	28,6 ml
	EDTA pH8	50 ml
TB (Terrific Broth) Medium	Bacto-Trypton	12 g/l
	Hefeextrakt	24 g/l
	Glycerin	4 ml/l
	Kaliumphosphatpuffer	100 ml/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,17 M / 0,72 M
TBS-T pH 7,6	Tris	0,6%
	HCl	0,2%
	Natriumchlorid	0,1%
	Tween-20	0,1%
Triton-Lösung	Triton X-100 in PBS	0,5%
Zellkulturmedium	FCS	10%
	Penicillin-Streptomycin	1 %
	NEAA	1%
	in DMEM	

### 3.2.5. Chemikalien

Name	Firma
1 kbp DNA ladder	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
100 bp DNA ladder	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland
Agarose peqGold Universal	Peqlab, Erlangen, Deutschland
BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
FH535	Sigma-Aldrich, Deutschland
GelStar	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Genitaminsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LiCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MTT	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
PBS-Pulver für 10x PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	<b>Sigma-Aldrich, Deutschland</b>
PKF118-310	<b>Sigma-Aldrich, Deutschland</b>
Probenpuffer Bluejuice	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
rh-Wnt3a	<b>R&amp;D Systems,</b> Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
S.O.C. Medium	<b>New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland</b>
Trypanblau	<b>Sigma-Aldrich, Deutschland</b>
Trypsin	<b>Sigma-Aldrich, Deutschland</b>
XAV939	<b>Sigma-Aldrich, Deutschland</b>

### 3.2.6. Enzyme

#### 3.2.6.1. Restriktionsenzyme

Alle benutzten Restriktionsenzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von der Firma New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland, bezogen.

#### 3.2.6.2. Polymerasen

Für Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde im Testansatz der PCR-Mix myTaq RedMix von Bioline, Luckenwalde, Deutschland benutzt. Im präparativen Ansatz wurde die Polymerase Phusion genutzt und von Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland bezogen.

## 3.3. Nukleinsäuren

### 3.3.1. Primer und Oligonukleotide

Alle Primer wurden selbst designed und über die Firma eurofins MWG Operon, Eberswalde, Deutschland bestellt.

Primernamen	Sequenz	Verwendung
<b>3xFop_SacI_for3</b>	5'-TTACCGAGCTCCCTTTGGCCTTACCC -3'	Klonierung pDisplay-STE4 -1-5
<b>3xTop_SacI_for2</b>	5'-TTACCGAGCTCCCTTTGATCTTACCC -3'	Klonierung pDisplay-STE4 -1-5
<b>Bcat_Xmal_rev2</b>	5'-aaggaccgggacaggtcagatcaaa -3'	Klonierung pBcatenin-EGFP
<b>bcat-EGFP_NotI_r</b>	5'- GCTGATTATGATCTAGAGTCGC-3'	Klonierung pBcatenin-EGFP
<b>bCat-EGFP_rev</b>	5'-gctcaccattagatcccggtc -3'	Klonierung pBcatenin-EGFP
<b>bcatSalII_for2</b>	5'-caccatggtcgacacatggctactcaa -3'	Klonierung pBcatenin-mCherry
<b>Bcat-vorne</b>	5'-gaattcatggctactcaagctgatttg -3'	Klonierung pBcatenin-mCherry
<b>Beta-cat-for1</b>	5'-cgtgagggcttactggccatc-3'	Sequenzierung
<b>Beta-cat-for2</b>	5'-CCTTTGCGTGAGCAGGGTGCC -3'	Sequenzierung
<b>Beta-cat-for3</b>	5'-caggtgacagcaatcagctggc -3'	Sequenzierung
<b>EGFP-end_rev</b>	5'-atccggcggtcagaactccagcac -3'	Sequenzierung
<b>m-cherry-hinten</b>	5'-ccgcggaacatgtcgagcagg -3'	Klonierung pBcatenin-mCherry
<b>mCherry-rück</b>	5'-cccggggcaggtcagatc -3'	Klonierung pBcatenin-mCherry
<b>pDisplay_for</b>	5'-CGGCTTGGGGATATCCACCATG-3'	Sequenzierung, pDisplay-EGFP
<b>pDisplay_rev</b>	5'-GGCTGATCTCGAGCGGCCGCC -3'	Sequenzierung
<b>pDSeq_rev</b>	5'-CAGGAGTGTGTCTGTCTCCAT -3'	Sequenzierung
<b>SNAP_end_rev</b>	5'-TGCGGCCGCTCATAATTAACCTC -3'	Klonierung pBcatenin-SNAP
<b>SNAP_shift_for</b>	5'-CCGTGAATTCCACCATGGACAAAG -3'	Klonierung pBcatenin-SNAP
<b>SNAP_shift_rev</b>	5'-CTTTGCCATGGTGGAAATTCACCGG -3'	Klonierung pBcatenin-SNAP

### 3.3.2. Vektorkonstrukte

Name	Quelle	Verwendung
<b>pDisplay</b>	Invitrogen / Life Technologies Deutschland, Darmstadt	pDisplay-EGFP, pDisplay- $\Delta$ Top-EGFP3a, pDisplay-STE4-1-5, pBcatenin-EGFP
<b>pDisplay-<math>\Delta</math>Fop</b>	MPI Dortmund, Deutschland	FOP-Sequenz zur weiteren Verwendung
<b>pDisplay-<math>\Delta</math>Top</b>	MPI Dortmund, Deutschland	TOP-Sequenz zur weiteren Verwendung
<b>pEGFP</b>	MPI Dortmund, Deutschland	cDNA für eGFP
<b>pmCherry-N1</b>	Clontech / Takara Bio Europe, Saint- Germain-en-Laye, Frankreich	pBcatenin-mCherry, Plasmidrückgrat für pBcatenin-SNAP
<b>pQE32-bcatenin</b>	MPI Dortmund, Deutschland	cDNA für $\beta$ -Catenin

## 3.4. Zellen und Bakterien

### 3.4.1. Zellen

Name der Zelllinie	Quelle
<b>F3-raf-mCherry</b>	Zur Verfügung gestellt von P. Reischmann, Zweibrücken, Deutschland
<b>HCT116</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>HEK293</b>	American Type Cell Collection, Middlesex, UK
<b>HEK293T</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>HEKB</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>HT29</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>MDCK</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>MDCK-F3</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>NIH3T3</b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>SW480</b>	MPI Dortmund, Deutschland

### 3.4.2. Bakterienstämme

Stamm	Quelle
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	MPI Dortmund, Deutschland
<b>NEB-10<math>\beta</math></b>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<b>TG1</b>	MPI Dortmund, Deutschland

### 3.5. Verbrauchsmaterialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Bakterienröhrchen 10 ml</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Cellview Glasbottom 4- Kompartiment Schale</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>4-Well-Platte</b>	PAA, Cölbe, Deutschland
<b>Deckgläschen</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Einweg-Pasteurpipetten</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Falcons 15 ml, 50 ml</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Kryoröhrchenhalter</b>	Neolab, Heidelberg, Deutschland
<b>Kryoröhrchen</b>	Neolab, Heidelberg, Deutschland
<b>Objektträger</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Parafilm M Verschlussfolie</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>PCR-Gefäße 0,5 ml</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>PCR-Ketten 0,2 ml</b>	Neolab, Heidelberg, Deutschland
<b>Petrischalen</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Pipettenspitzen 0,5-10 µl</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Pipettenspitzen 10-200 µl, 100- 1000 µl</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Sterilfilter</b>	Neolab, Heidelberg, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen 50 ml und 250 ml</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturplatten 6-well, 24-well, 96-well</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturplatte µClear schwarz 96-well</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturplatte glass-view schwarz 24-well</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Konstruktion der Vektoren

#### 4.1.1. Vektoren für den Einsatz in Screening-Assays

##### 4.1.1.1. *pDisplay-ΔTop-EGFP3a / pDisplayΔFop-EGFP7b*

Die Klonierung der Vektoren pDisplay-ΔTop-EGFP3a und der entsprechenden Negativ-Kontrolle pDisplay-ΔTopEGFP7b erfolgte schrittweise aus den Vektoren pDisplay-EGFP und pDisplay-ΔTop bzw. pDisplay-ΔFop. Im ersten Schritt wurden die beiden Templates mit SfiI geschnitten; pDisplay-EGFP wurde zusätzlich mit dem Enzym XmaI verdaut. Die gewünschten DNA-Teilstücke wurden durch Agarosegel-Aufreinigung erhalten und durch Ligation miteinander rekombiniert; der Ansatz in E.coli wie beschrieben transformiert. Der Erfolg der Klonierung erfolgte zum einen durch Test-PCR mit dem Primerpaar pDisplay\_for/pDisplay\_rev und zum anderen durch Sequenzierung der relevanten Sequenz durch LGC Genomics. Im finalen Vektorkonstrukt sind jeweils drei TOP- (5'-CCCTTTGATC-3') bzw. FOP (5'-CCCTTTGGCC-3') -Sequenzen hintereinander enthalten, auf welche ein T7-Promotor und anschließend die Sequenz EGFP folgt.

##### 4.1.1.2. *pDisplay-STE4-1-5 und pDisplay-STE4-1-c*

Um eine Verstärkung der Wnt-Antwort zu erzielen, wurden die im Vektor ΔTop-EGFP3a enthaltenen drei TCF/LEF-Bindemotive zu insgesamt sechs Top-Sequenzen verdoppelt. Hierfür wurde in einem ersten Schritt eine PCR mit den Primern 3xTop\_SacI-for2 und pDSeq\_rev auf das Template pDisplay-ΔTop durchgeführt und dadurch eine zusätzliche SacI-Schnittstelle upstream der ersten Top-Sequenz eingeführt. Die im Agarosegel aufgereinigte DNA-Sequenz, sowie der Ursprungsvektor, wurden anschließend mit dem Enzym SacI geschnitten, sodass die Teilstücke an beiden Enden identische Überhänge aufwiesen und diese wurden im Anschluss wieder miteinander ligiert. Das neu erhaltene Zwischenkonstrukt pDisplay-SuperTop wurde mit den Enzymen SacI und PspOMI verdaut und im Agarosegel aufgereinigt. Parallel dazu wurde die Sequenz EGFP aus dem Template pDisplay-EGFP ebenfalls unter Verwendung der Enzyme SacI und PspOMI geschnitten und mit Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Beide genannten Teilstücke wurden durch Ligation und Transformation in E. coli miteinander rekombiniert.

Der Erfolg der Klonierung pDisplay-SuperTop-EGFP wurde durch Sequenzierung (Firma GATC Biotech AG) überprüft. Es wurden mehrere Klone mit geringfügig verschiedenen Sequenzen erhalten. Durch Transfektion der Klone in HEK 293T Zellen wurde die Funktionalität überprüft. Als final verwendeten Vektoren zeigten pDisplay-STE4-1-5 in HEK 293T-Zellen und pDisplay-STE4-1-c in SW480-Zellen die höchste Reaktivität.

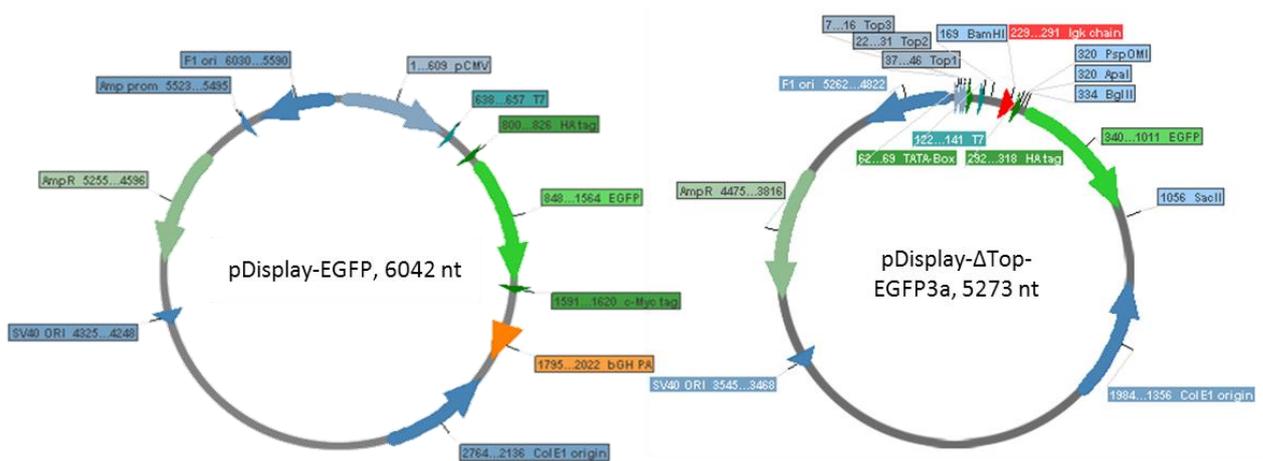
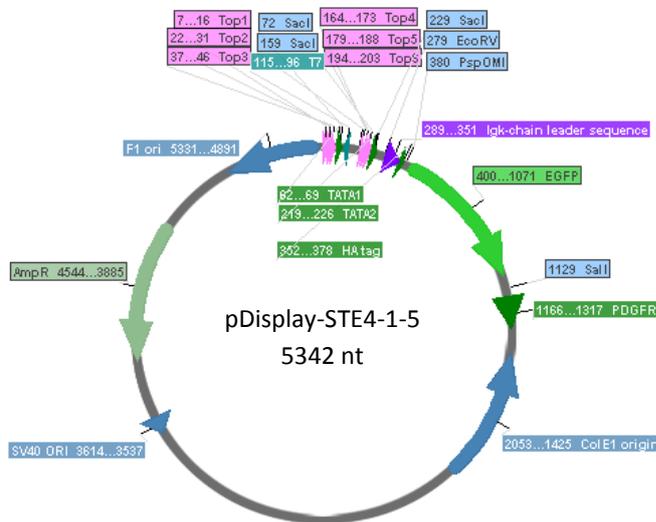


Abbildung 8: Vektorkarten der klonierten Reporter-genkonstrukte pDisplay-EGFP (links) und pDisplay-ΔTop-EGFP3a. Dargestellt sind die wichtigsten codierenden Bereiche im Vektor, durch Pfeile hervorgehoben und deren Richtung bezeichnet.



```

Top 1 - 3                                     TATA1
CGCGCGCCCTTTGATCTTACCCCTTTGATCTTACCCCTTTGATCTTACCGTAGGGAGGCTTAFATAAGCAGAGCTCGGTACCAAGCTTGGGTCTCCCTA < 100
T7
TAGTGAGTGTGATTAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCCCTTTGATCTTACCCCTTTGATCTTACCCCTTTG < 200
TATA2                                         EcoRV      M
ATCTTACGTAGGGAGGCTTATATAAGCAGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCGCAGTGTGCTGATTTGCTTGGGGGATATCCACCATGGAGACAGAC < 300
Igk-chain leader sequence                    HA tag
ACACTCTGCTATGGGTACTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGCATATCATATGATGTTCCAGATTAATGCTGGGGGCCAGCCGGCCAGATCTA < 400
TGGTGAGCAAGGGGAGGAGCTGTTTCACCGGGGTGGTCCCATCTGCTGGTGGAGCTGGAGCGGAGTAAADGGCCACAAGTTCCAGGCTGTCGGGGAGGG < 500
CGAGGGGATGCCACCTAAGCCAGCTGAACCTGAAGTTCATCTGACCCACCGGCAAGCTGCCCGGTCGGCCCGCCAGCCCTCGTGAACCAACCTGACCTAC < 600
GGGTGCACTGCTTCAGCCGCTTACCCGACCCACATGAAGCAGCAAGACTTCTTCAAGTCCGSCCATGCCGAGGCTAGCTCCAGGAGCGCACCATCTTCT < 700
EGFP
TCAAGGAGAGGGCACTACAAGCCGCGGAGGTTGAGGTTGAGGCGGACACCCCTGGTGAACCGCATGAGCTGAAGGGCATGACTTCAAGGAGGA < 800
CGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACGCCACAAGCTCTATATCATGGCCGACAGCAGAAGAAAGGATCAAGGTTGAACCTTCAAG < 900
ATCCGCCACAACATCGAGGAGGCGAGGCTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAAGGCGCCGCTGCTGCTGCCCGGCAACCACT <1000
ACCTGAGCACCAGTCCGCTGAGCAAGACCCCAAGGAGGCGAGTCAATGCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCAT <1100
Sall
GGACGAGCTGTACAAGCCGGCTGCGAGGTCGACGAAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGCTGTTGGGCGAGGACAGCAGGAGGTCATGCTG <1200
PDGFR
GTGCCACACTCTTGCCTTTAAGGTTGGTGGTGCATCTCAGCCATCTTGGCCCTGGTGGTGCATCAACATCATCTCCCTTATCATCTCATCATGCTTTGGC <1300
*
AGAGAGCCACGGTTAG < 1317

```

Abbildung 9: Vektorkarte (oben) und Sequenzausschnitt (unten) des Reporter-genkonstruktes pDisplay-SuperTopEGFP4-1-5, wie er in den späteren Transfektionen eingesetzt wurde. Im Vergleich zum Konstrukt pDisplay-ΔTop-EGFP3a enthält dieser sechs TOP-Bindemotive, drei jeweils geteilt durch einen zusätzlichen T7-Promotor und eine zusätzliche TATA-Box.

Die Erstellung des Blindvektors pDisplay-SuperFop-EGFP10a erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise mit pDisplay- $\Delta$ Fop als Ausgangsvektor. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung gezeigt. Der finale Vektor wurde exemplarisch sowohl in SW480- als auch HEK 293T-Zellen transfiziert, um die fehlende Expression von eGFP aufgrund des modifizierten TCF/LEF-Bindemotivs zu zeigen.

#### 4.1.1.1. *pSTeneu4 und pSTeneu7*

Um die in den pDisplay-Vektoren enthaltene Verankerungssequenz *Igk-chain leader sequence* zu entfernen, wurde der Vektor durch Einsatz der Restriktionsenzyme BamHI und BglII verkürzt. Die Verwendung dieses Enzym-paares resultierte in der Entstehung kompatibler Enden, sodass nach Restriktionsspaltung das aufgereinigte Produkt wieder direkt ligiert und transformiert werden konnte.

Der Klonierungserfolg wurde zum einen durch Testrestriktion mit EcoRV und zum anderen durch Sequenzierung bestätigt.

#### 4.1.2. *Vektoren für die qualitative Analyse des Wnt-Signalweges*

##### 4.1.2.1. *pBcatenin-mCherry*

Die Erstellung des Reportergerkonstruktes erfolgte in einem mehrstufigen Prozess. In einem ersten Schritt wurde mit dem PCR Cloning Kit die Sequenz des  $\beta$ -Catenins aus dem Grundvektor pQE32- $\beta$ catenin in den Zwischenvektor pDrive verlagert. Anschließend wurde in einer Mutagenese-PCR die notwendige  $\beta$ -Catenin-Sequenz erstellt und während der PCR upstream eine Sall-Schnittstelle (Primer bcat\_SalII\_for2) und downstream eine XmaI-Schnittstelle (bcat\_XmaI\_rev2) eingefügt. Nach elektrophoretischer Aufreinigung des gewünschten Produktes wurde die DNA mit den genannten Enzymen verdaut, ebenso wurde der Basisvektor pmCherry-N1 mit den genannten Enzymen geschnitten und mit alkalischer Phosphatase versetzt. Die Klonierung wurde durch Ligation und Transformation in E.coli abgeschlossen.

Das Reporterkonstrukt pBcatenin-mCherry wurde erfolgreich erstellt. In diesem Vektor ist die Sequenz des  $\beta$ -Catenins upstream und *in frame* mit der Sequenz des roten fluoreszierenden Proteins mCherry fusioniert. Die Expression des Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen wird durch den enthaltenen konstitutiven pCMV-Promoter sichergestellt. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Test-Restriktionsspaltung mit EcoRI und durch Test-PCR (bcat\_for1/bcat\_XmaI\_rev2) validiert und die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs festgestellt.

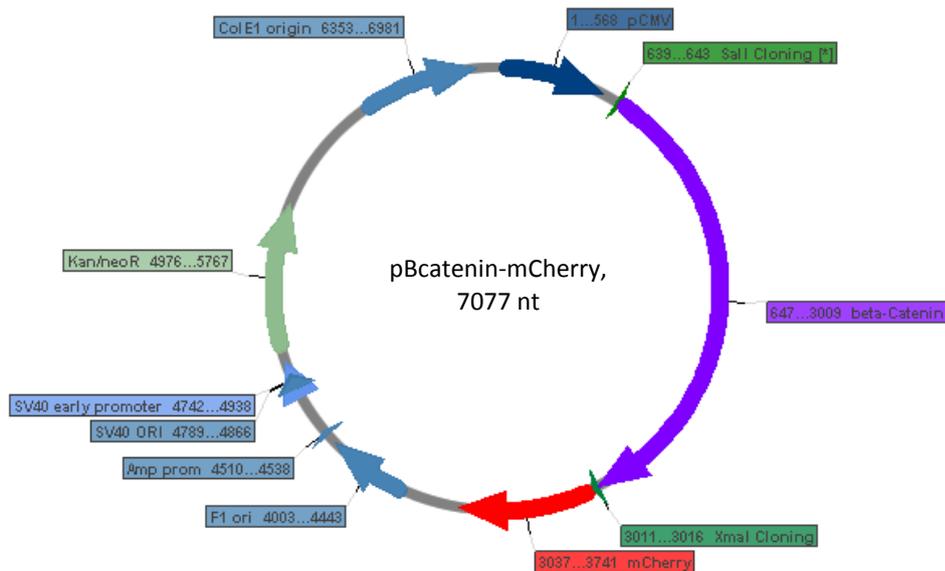


Abbildung 10: Vektorkarte des Reportergenkonstrukts pBcatenin-mCherry, in dem die Sequenz des  $\beta$ -Catenins (lila) *downstream* mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry *in frame* gekoppelt wurde. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines pCMV-Promotors.

#### 4.1.2.2. *pBcatenin-EGFP*

Als ersten Schritt der Klonierung des Vektors pBcatenin-EGFP wurden die notwendigen DNA-Teilstücke durch Restriktionsspaltung aus dem Ausgangsvektor pBcatenin-mCherry mit den Enzymen BamHI und NotI und dem Vektor pDisplay-eGFP mit BglII und NotI erstellt. Nach dieser Umklonierung wurde durch eine kombinierte Mutagenese-Overlap-Extension-PCR ( $\beta$ cat-eGFP-NotI\_rev / bcat\_EcoRV\_for / bcat\_EGFP\_for / bcat\_EGFP\_for) das Leseraster zwischen  $\beta$ -Catenin und eGFP wiedererfolgreich korrekt hergestellt. Im fertigen Vektor ist das Fusionsprotein  $\beta$ Catenin-eGFP unter der Kontrolle des pCMV Promotors codiert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Bereiches festgestellt.

#### 4.1.2.3. *pBcatenin-SNAP*

Im ersten Schritt zur Herstellung des Reportergenkonstrukte pBcatenin-SNAP wurden die Ausgangsvektoren pSNAPf und pBcatenin-mCherry mit den Enzymen NotI und AgeI geschnitten, pBcatenin-mCherry wurde anschließend zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach der Aufreinigung der gewünschten DNA-Teilstücke aus dem Agarosegel und anschließender Ligation wurde mit Hilfe einer Overlap-Extension-PCR (Snap\_shift\_for / Snap\_shift\_rev / Snap\_end\_rev /  $\beta$ Cat\_for1) das Leseraster zwischen den Einzelsequenzen korrigiert. Die Richtigkeit der gewünschten Sequenz wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Bereiches durch die Firma GATC Biotech festgesellt.

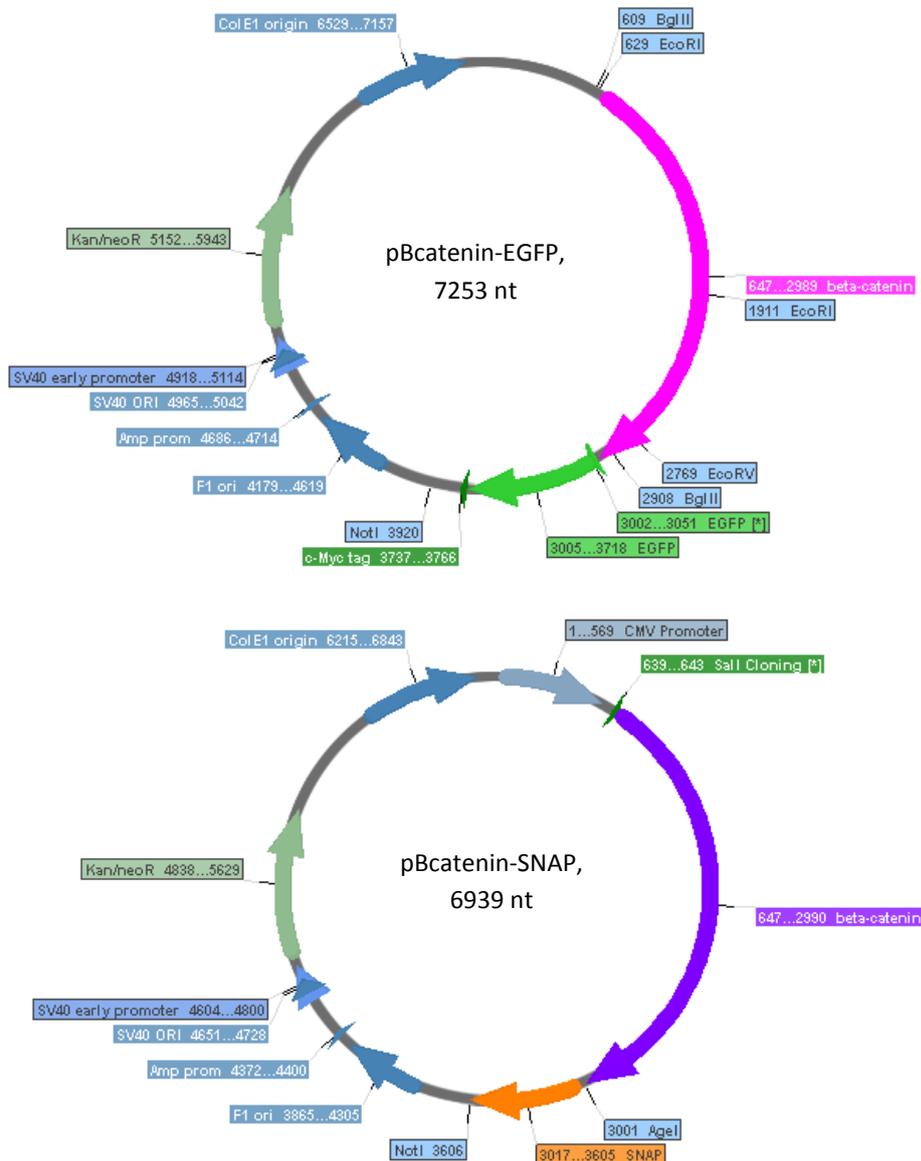


Abbildung 11: Vektorkarten der Reportergenkonstrukte pBcatenin-EGFP (oben) und pBcatenin-SNAP (unten). Analog zu Abbildung 10 wurde hier  $\beta$ -Catenin (pink bzw. lila) an das grün fluoreszierende Protein EGFP (grün) bzw. den Protein-tag SNAP (orange) gekoppelt. Der weitere Aufbau ist mit Ausnahme der klonierten Schnittstellen identisch.

## 4.2. Wahl der Zelllinien

### 4.2.1. Zelllinien für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs

Zur korrekten Darstellung und Beobachtung des Wnt Signalwegs in lebenden Zellen war eine Zelllinie notwendig, die den gesamten Wnt-Expressionsapparat korrekt enthält, leicht zu handhaben und gut zu transfizieren ist. Ebenso sollte eine Modulation des Wnt Signalwegs deutlich erkannt werden. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf HEK293T Zellen, um die erstellten Reportergenkonstrukte in transienten Transfektionen zu testen. Für die stabile Transfektion des Reportergenkonstrukts wurde auf die Zelllinie HEK293 zurückgegriffen, um diese leichter durch Zugabe des Antibiotikas G418 nach erfolgreicher Transfektion selektieren zu können. Darüber hinaus wurde eine modifizierte Zelllinie

HEKB eingesetzt, welche einen Tetracyclin-regulierten Promoter enthielt. Diese wurde in der stabilen Transfektion als Aktivierungsassay eingesetzt.

#### *4.2.2. Zelllinien für die Inhibierung des Wnt-Signalwegs*

Nach Nachweis der Spezifität des Reportergenkonstruktes war eine Zelllinie notwendig, die für negative Modulationen des Wnt-Signalwegs geeignet war. Dafür war eine konstitutive Aktivierung des kanonischen Signalweges durch Mutation erforderlich. Aus dem in der Arbeitsgruppe vorhandenem Cryo-Zelllinienpool wurden verschiedenen Zelllinien für diesen Zweck getestet: NIH3T4, SW480, HCT116, HT29 und HeLa. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Kultivierbarkeit, ihrer Handhabung und ihrer Transfizierbarkeit geprüft. Da die Darmkrebszelllinie SW480 eine APC-Mutation enthält, gut transfizierbar und gut kultivierbar war, wurde diese in den Experimenten zur stabilen Transfektion eingesetzt. HT29, welche ebenfalls eine gute Handhabung und Transfizierbarkeit aufwies, wurden aufgrund des mit fortschreitender Kultivierung immer heterogenerem Phänotyps nicht weiter für die stabile Transfektion eingesetzt, zeigten aber sehr gute Resultate bei der transienten Transfektion und somit der Validierung der erstellten Vektoren.

#### *4.2.3. Zelllinien für Nachverfolgung von $\beta$ -Catenin in der Zelle*

Für den Einsatz der  $\beta$ -Catenin-Fusionsreporter wurden HEK293 Zellen aufgrund ihrer leichten Transfizierbarkeit verwendet. Die Selektion stabiler Klone gestaltete sich allerdings schwierig, da die Zellen bereits nach kurzer Zeit starben. Daraufhin wurden die Reportergenkonstrukte nur transient in HEK293 Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden MDCK-Zellen verwendet, um einen erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel zu exprimieren. Dies gestaltete sich langwierig aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und der hohen Stabilität gegenüber Geneticin. Die Selektion der Klone MDCK- $\beta$ cat-mCherry war erfolgreich, die Zellen zeigten aber ein differenziertes Muster an Fluoreszenz. Nach einiger Zeit in Kultur verschwand dieses Signal vollständig.

### 4.3. Etablierung der Testsysteme zum Screening nach potentiellen Modulatoren des Wnt-Signalweges

#### *4.3.1. LiCl-Aktivitätsassay in HEKB-Zellen*

Für Aktivitätstests des pDisplay- $\Delta$ Top-EGFP3a wurde dieser in HEKB Zellen stabil transfiziert. Um den Klon zu selektieren, welcher die beste Reaktion auf Wnt-Signalwegs-Aktivierung anzeigt, wurde ein LiCl-Assay entwickelt, in welchem durch unterschiedliche LiCl-Konzentrationen auch die Sensitivität des Konstrukts bestimmt werden sollte.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst. Im Vitalitätstest zeigte sich zunächst, dass die Zugabe von LiCl keinen Einfluss auf die Zellvitalität hatte – die Zellen wuchsen nach Zugabe von 10 mM LiCl lediglich langsamer als ohne. In HEKT-EGFPA1 – Zellen, welche die nicht regulierte Positiv-Kontrolle darstellte, waren allerdings große Schwankungen in der Kultivierung erkennbar, im Mittel war die Zellzahl jedoch gleichbleibend, während stabil transfizierte  $\Delta$ Top3a-Klone allgemein langsamer wuchsen. Die untransfizierten HEKB-Zellen zeigten eine Verdopplungsrate von 24 Stunden. Nach Prüfung von insgesamt fünf verschiedenen stabil transfizierten Klonen zeigte sich der Klon HEKB- $\Delta$ Top3a F10 als am geeignetsten für die Anwendung in einem Assay. Der Klon zeigte eine insgesamt recht niedrige Fluoreszenz und Zellzahl, bei Betrachtung der Fluoreszenz pro Zelle zeigte sich jedoch am deutlichsten, dass die Zugabe von 10 mM LiCl eine eindeutig fluoreszenzsteigernde Wirkung sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden gegenüber der Kontrolle aufwies (über das Doppelte). Beim Auftrag der Fluoreszenz pro Zellen in HEKT-EGFPA1-Zellen zeigte sich zwar ein differenziertes Bild, insgesamt schien hier die Fluoreszenz pro Zelle durch LiCl allerdings abzunehmen. In HEKB Zellen zeigte sich wie erwartet nur ein Hintergrundsignal.

#### *4.3.2. Aktivitätsassay gekoppelt mit Wnt-Fishing*

HEKT-STE4-1-5 1C Zellen wurden wie unter 4.3.1 beschrieben in einem 96-Well-formatigem Assay eingesetzt. Die Aktivierung des WNT-Signalwegs erfolgte durch Zugabe von LiCl (0,01 mM ... 10 mM) oder des Proteins Wnt3a (20, 50, 100 ng/ml). Zusätzlich wurden die Zellen neben der reinen Fluoreszenzmessung unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und so deren Fluoreszenzsignal dokumentiert. Die Ergebnisse dieser Aktivierungsversuche zeigten deutlich, dass LiCl zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung des Fluoreszenzsignals führte. Dieser Effekt trat messbar am stärksten bei einer Konzentration von 1 mM und nach einer Zeit von 24 Stunden nach Zugabe auf; in den mikroskopischen Beobachtungen war hier der größte Effekt nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 10 mM LiCl zu verzeichnen.

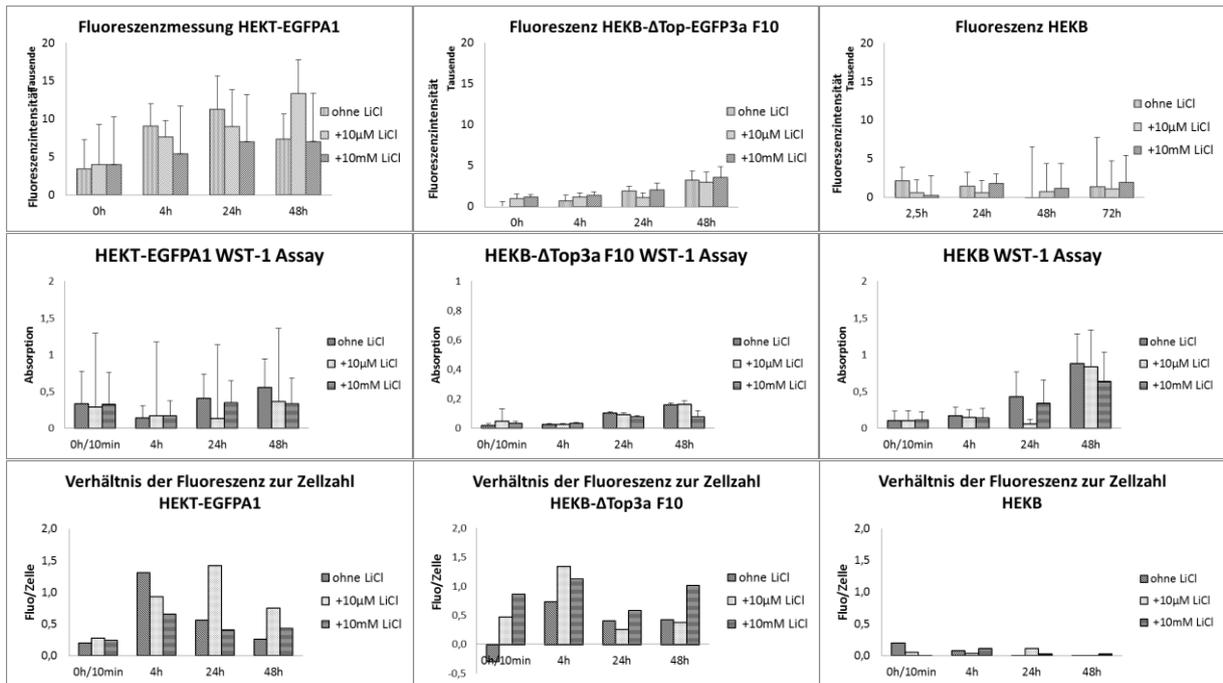


Abbildung 12: Erste Versuche im Assayformat mit den neuen Zelllinien HEKT-EGFPA1, HEKB- $\Delta$ Top3a F10 und der untransfizierten Zelllinie HEKB. Aufgetragen sind jeweils die gemessene Fluoreszenz (abgezogen des Blindwerts, obere Reihe), die Ergebnisse im Vitalitätstest WST-1 (Mitte) und den sich daraus ergebenden Fluoreszenzwerten bezogen auf die Zellzahl. Es ist eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz pro Zelle in HEKB- $\Delta$ Top3a F10 Zellen zu sehen (Steigerung auf über das Doppelte) nach 24 Stunden gegenüber den unbehandelten Zellen.

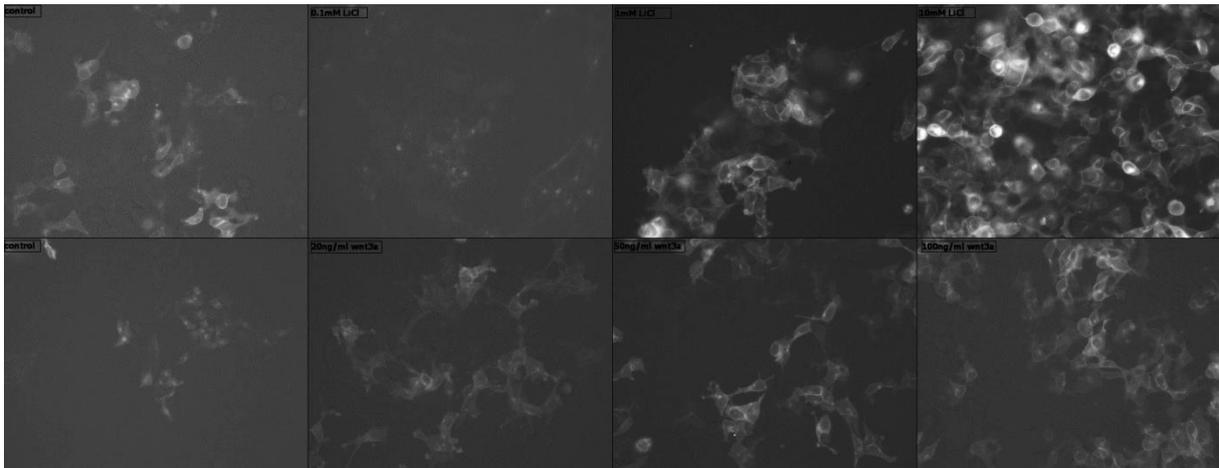


Abbildung 13: Visueller Vergleich der eGFP-Expression von HEKT-STE4-1-5 1C Zellen 24 Stunden nach Aktivierung entweder mit LiCl (obere Reihe v.l.n.r: Kontrolle, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM LiCl) oder mit Wnt3a (untere Reihe v.l.n.r: Kontrolle, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml Wnt3a). Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration des aktivierenden Agens auch die Signalstärke der Fluoreszenz zunimmt und bei einer verwendeten Konzentration von 10 mM am höchsten ist. Die Aktivierungsversuche wurden in einer 24-well-Platte durchgeführt, nachdem die Zellen 24 Stunden darin kultiviert worden waren. Jedes Bild wurde am Observer.Z1 (Zeiss) bei einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Ein ähnlich starker Effekt zeigte sich nach der Aktivierung der Zellen durch Wnt3a in einer Konzentration von 20 ng/ml. Höhere Konzentrationen zeigten allerdings keine Erhöhung des Fluoreszenzlevels – 100 ng/ml bewirkten sogar ein Rückgang der Fluoreszenz aufgrund einer starken Unverträglichkeit auf die Zellen. Nach 48 Stunden wurde die höchste Fluoreszenz in Zellen, welche mit 10 mM LiCl behandelt wurden, gemessen. Abbildung 14 verdeutlicht außerdem anhand der

gestrichelten Linien, dass der größte Effekt auf den Wnt-Signalweg nach 24 Stunden, weniger nach 48 Stunden sichtbar war, weshalb für weitere Experimente vor allem dieser Zeitraum gewählt wurde.

Eine Besonderheit sowohl des pDisplay- $\Delta$ Top-EGFP3a Vektors als auch des modifizierten pDisplay-STE4-1-5 Konstrukts besteht in der Sequenz sowohl der Ig $\kappa$ -chain-Signalsequenz up-, als auch der PGDFR-Verankerungssequenz downstream der EGFP Sequenz. Diese haben nach Expression des grünen Fluoreszenzproteins durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs dessen Verankerung auf der Außenseite der Zellmembran zur Folge. Gleichzeitig bewirkt diese Verankerung allerdings auch eine Konzentrierung des Signals selbst nachdem keine weitere Expression mehr erfolgte. Diese Gegebenheiten wurden für eine spezielle Art des Wnt-Aktivitätsassays ausgenutzt: Dem Herausfischen von WNT-aktiven Zellen aus einem Zellpool von Zellen mit differenziert exprimiertem Wnt-Signalweg. Zu diesem Zweck wurden die Zellen während der Kultivierung in Flaschen mit entweder LiCl oder Wnt3A in den genannten Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die Pellets von je  $5 \times 10^6$  Zellen mit *Magnetic Beads*-assoziierten anti-GFP-Antikörpern beladen und in einem magnetischen Feld diejenigen Zellen voneinander getrennt, welche GFP auf ihrer Außenseite exprimierten, von denen, welche keine oder nur eine schwache Expression zeigten. Dafür wurden LD-Säulen genutzt (Miltenyi Biotech AG). Als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie HEKT-EGFPA1 eingesetzt.

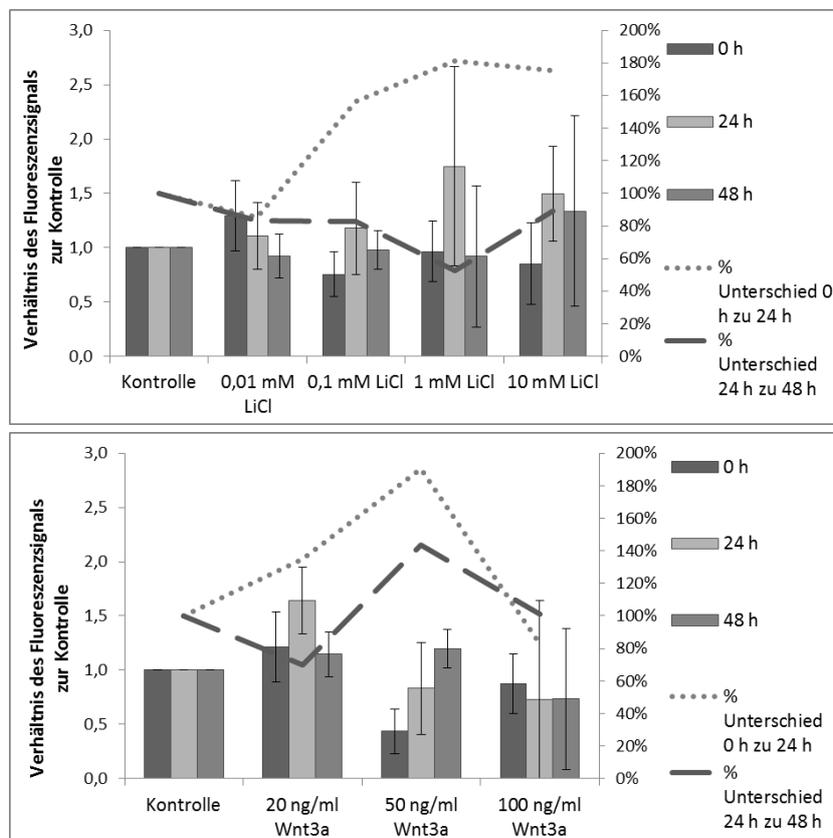


Abbildung 14: Darstellung der Messungen von HEKT-STE4-1-5 1C Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden konzentrationsabhängiger Aktivierung mit LiCl (oben) oder mit WNT3A Protein (unten) und deren Veränderung über die gemessene Zeit. Die Fluoreszenzwerte wurden am ELISA-Reader aufgenommen, ebenso die Vitalität der Zellen durch WST-1 Assay. Die aufgetragenen Werte stellen das Verhältnis der Fluoreszenz gegenüber der unbehandelten Kontrolle dar.

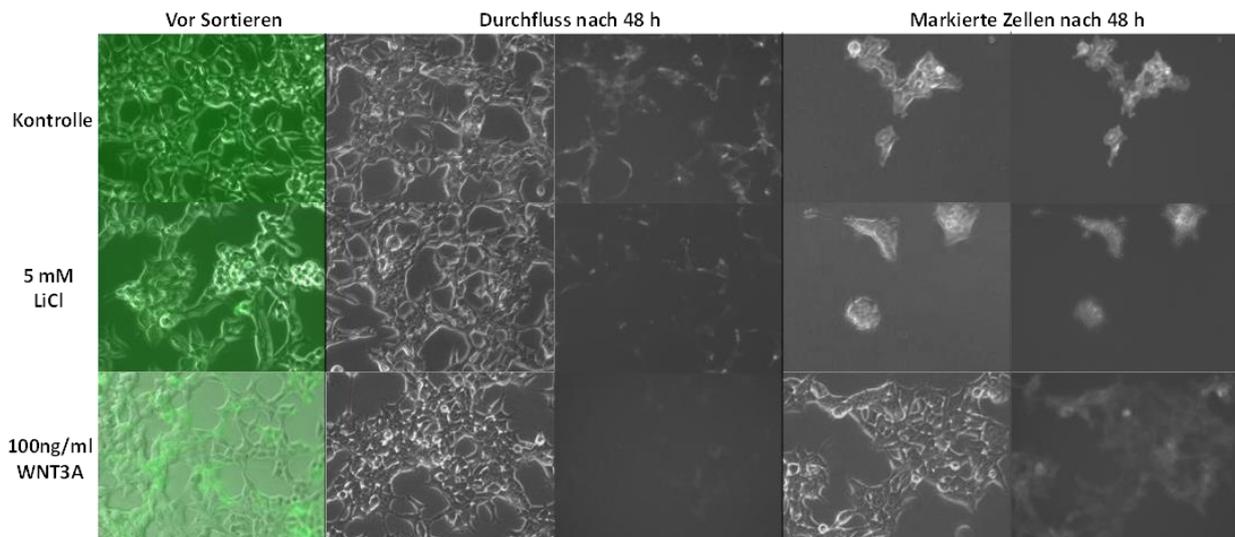


Abbildung 15: HEKT-STE4-1-5 1C Zellen vor dem Sortiervorgang (linke Spalte, Phasenkontrast und Fluoreszenzkanal übereinandergelegt) und die sortierten Zellen nach 48 Stunden in Kultur Mitte: Phasenkontrast und Fluoreszenz der Zellen, welche nicht im Magnetfeld zurückgehalten wurden. Rechte Spalte: Phasenkontrast und Fluoreszenz der Zellen, welche als positiv sortiert wurden. Alle Aufnahmen wurden am Observer.Z1 (Zeiss) bei 200-facher Vergrößerung gemacht.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Sortierversuche: mit dem verwendeten Versuchsaufbau war es möglich, positive Zellen aus einem größtenteils negativen Zellpool zu fischen. Jede Fraktion der Zellen wurde nach dem Sortieren separat ausgesät und alle 24 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Dabei wurde deutlich, dass Zellen, welche als Positiv sortiert wurden, auch zu 100 % ein deutliches Fluoreszenzsignal aufwiesen, wohingegen Zellen, welche direkt im ersten Waschvorgang durch die Säulen gewaschen wurden, keine oder eine deutlich geringere Fluoreszenzstärke aufwiesen.

Die Positiv-Kontrolle HEKT-EGFPA1 stellte dabei mit 40 % den höchsten Anteil an positiv sortierten Zellen, ebenfalls wurden mit LiCl behandelte Zellen als positiv erkannt (25 % gegenüber 7,5 % der nicht-behandelten Kontrolle). Die Aktivierung mit Wnt3a zeigte keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle. Der erste gesammelte Durchfluss beinhaltete mindestens 50 % der anschließend gezählten Zellen. Insgesamt wurden nach Zählen der einzelnen Kompartimente deutlich weniger Zellen errechnet, als zu Beginn des Versuchs eingesetzt wurden. Insgesamt waren die verwendeten LD-Säulen nicht geeignet, um aus einer stark positiven Zellmischung wenige negative Zellen herauszufischen. Über 50 % wurden nicht erkannt oder die Masse an Zellen war so groß, dass viele auch positive Zellen rein mechanisch die Säulen passierten.

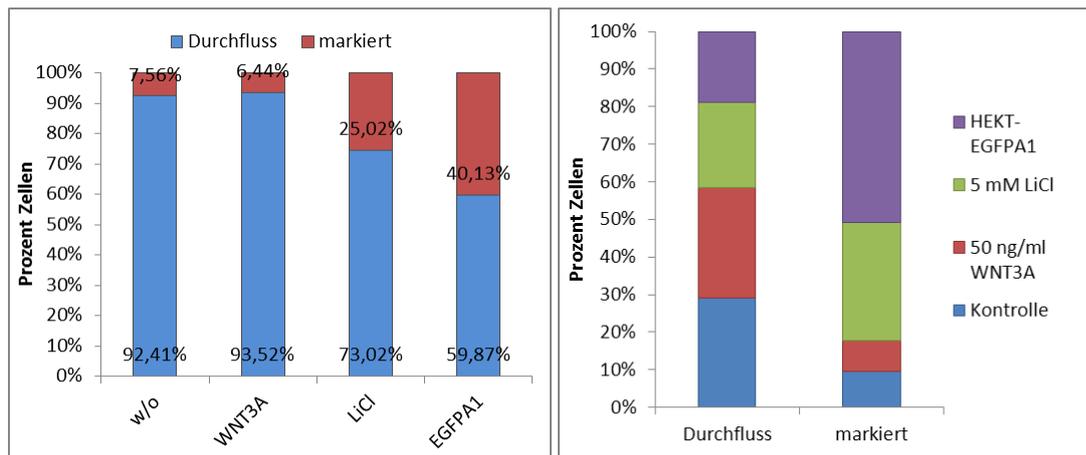


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der als positiv sortierten Zellen gegenüber dem Durchfluss der einzelnen, unterschiedlich behandelten Zellen (links) und die Gesamtzellzahl der gezählten Zellen (rechts).

### 4.3.3. Kompetitiver Aktivitätsassay in HEK293-ST<sub>E</sub>neu4 Zellen

#### 4.3.3.1. Analyse durch Fluoreszenzmessung im Fluoreszenzphotometer

Im kompetitiven Assay wurde zum einen die Effektivität des modifizierten Reportergerkonstruktes untersucht, zum anderen sollte auf dieser Grundlage ein Assayprotokoll optimiert werden, dass die verwendeten HEK293-ST<sub>E</sub>neu4 Zellen sowohl für Aktivierungs- als auch Inhibierungstests eingesetzt werden können. Als am effektivsten wurden die Klone HEK293-ST<sub>E</sub>neu4 A2 und A3 getestet. In den ersten Versuchen wurden diese Zellen sowohl mit LiCl als auch Wnt-Inhibitoren behandelt, sodass nur solche Zellen ein Fluoreszenzsignal zeigen sollten, sobald der Wnt-Signalweg durch LiCl aktiviert würde. Diese Überlegungen wurden teilweise bestätigt (Abbildung 17): Zellen, welche mit Inhibitoren behandelt wurden, zeigten keine oder eine deutlich verminderte Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle und gegenüber den nur mit 10 mM LiCl behandelten Zellen. Allerdings wurde eine erhöhte Fluoreszenz durch Aktivierung erst 48 Stunden nach Zugabe beobachtet, während sich nach 24 h noch kein Unterschied zeigte. Nach statistischer Auswertung aller acht Versuchsreihen, in denen die Zellen in jeweils fünf Wells zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden, zeigt sich allerdings ein anderes Bild (Abbildung 18): Während für den Klon HEK293-ST<sub>E</sub>neu4 A2 die These zutraf, dass die Zellen 24 h nach Aktivierung mit LiCl eine höhere Fluoreszenz zeigen als ohne und inhibierte Zellen eine geringere, musste diese Beobachtung allerdings nach weiteren 24h differenziert werden. Hier zeigte sich auch nach Behandlung mit LiCl und Inhibitoren eine höhere Fluoreszenzintensität als in Zellen, welche nur mit Inhibitor behandelt wurden (bis zu 25 % höhere Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrolle). Ausnahme bildete hier PKF118-310, wo der Effekt statistisch sogar umgekehrt wurde und allein durch Inhibitorzugabe die Fluoreszenz nach 48 h höher wurde als mit LiCl. Die Auswertung der Versuche mit HEK293-ST<sub>E</sub>neu4 A3 Zellen offenbarten sogar ein noch inhomogeneres Bild. Die mittleren Floreszenzen nach 24 h und 48 h unterschieden sich fast nicht voneinander, es zeigte sich allerdings auch kein

eindeutiger Trend: Zellen, welche im Medium LiCl beinhalteten, schienen zwar ein insgesamt höheres Signal zu zeigen, als solche ohne; eine eindeutige Grenze lässt sich jedoch nicht ziehen.

Zusätzlich zur Fluoreszenzmessung wurde der Zellvitalitätstest WST-1 durchgeführt, um eine Aussage über die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen zu treffen. Der Test wurde an die Fluoreszenzmessungen angeschlossen, also 48 h nach Zugabe der Chemikalien. Die erhaltenen Werte spiegeln somit die Anzahl der lebenden Zellen nach 48 Stunden wider. Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, dass durch gleichzeitige Zugabe von LiCl und Inhibitor die Zellvitalität oft leicht erhöht bleibt gegenüber der Behandlung nur mit den Inhibitoren. FH535 zeigt in jedem Fall eine hohe Zellmortalität, da sowohl mit als auch ohne zusätzliche Aktivierung mit LiCl die Zellzahl deutlich unter der Kontrolle liegt. Bezieht man nun in die Fluoreszenzmessung nach 48 h auch die erhaltene Zellzahl ein, zeigt sich eine sehr diffuse Verteilung: in A3 Zellen ist die Fluoreszenz pro Zelle nach Behandlung mit LiCl etwa doppelt so hoch wie die Kontrolle und ebenfalls nach gleichzeitiger Zugabe von Inhibitoren und LiCl, insgesamt jedoch nicht höher als die Kontrolle nur mit LiCl. Allerdings stellt FH535 einen deutlichen „Ausreißer“ aufgrund seiner geringen im WST-1-Assay ermittelten Zellzahl dar. In A2 Zellen zeigt mit Ausnahme von XAV939 eine relativ homogene Fluoreszenz pro Zelle, bei gleichzeitiger Zugabe von Inhibitor und LiCl ist diese sogar gegenüber den Kontrollen erhöht.

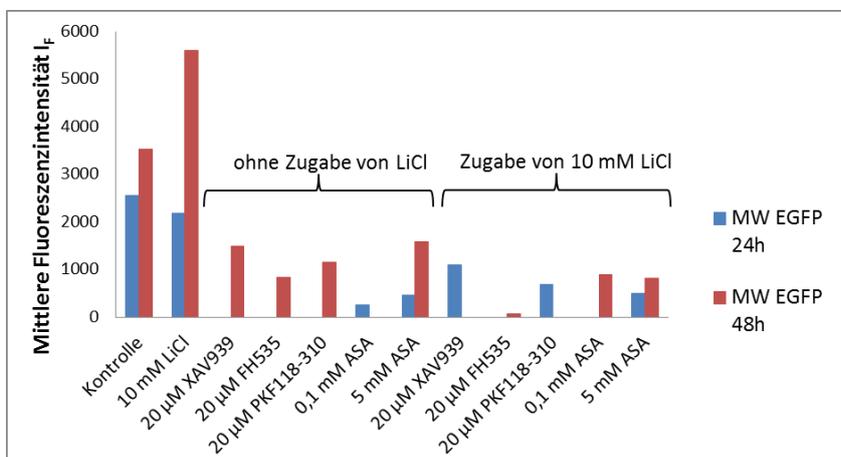


Abbildung 17: Erste kompetitive Inhibierungsversuche in HEK293-STeneu4 A3 Zellen. Zellen mit LiCl-Behandlung zeigten nach 48 Stunden eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrolle, alle mit Inhibitor behandelten Zellen zeigten keine bis nur eine geringe Fluoreszenz, sowohl 48 als auch 24 h nach Behandlung.

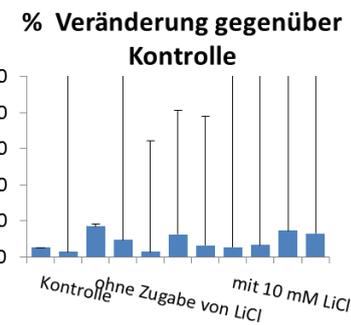
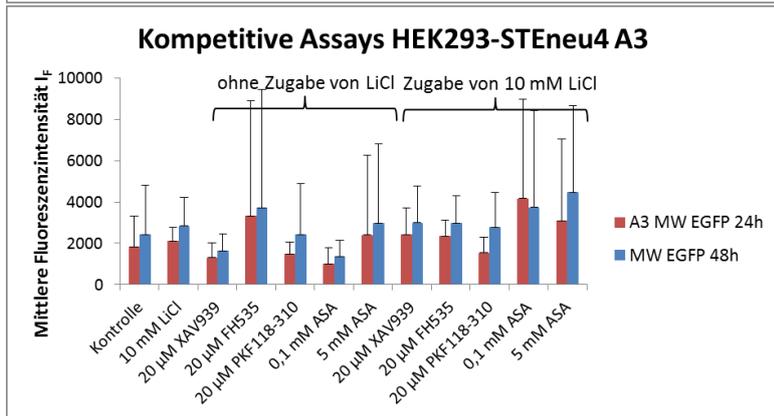
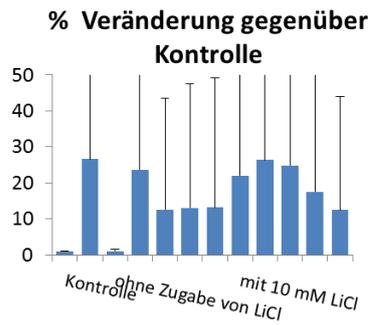
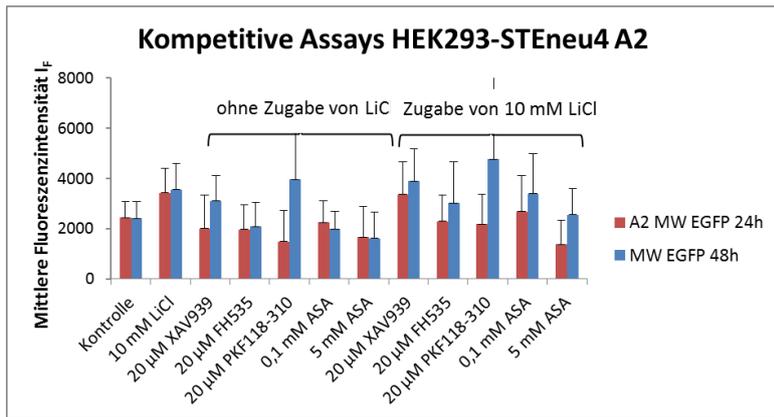


Abbildung 18: Statistische Auswertung von acht Versuchsreihen kompetitiver Assays in HEK293-STeneu4 A2 (oben) und A3 Zellen (unten). In A2 Zellen ist eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz nach Behandlung mit 10 mM LiCl gegenüber der unbehandelten Kontrolle erkennbar, allerdings auch im kompetitiven Verhalten zusammen mit den Inhibitoren nach 48 h. In den 24 h-Messungen hingegen zeigen sich die Fluoreszenzwerte mit Inhibitoren erniedrigt gegenüber der Kontrolle, wie erwartet. Die Auswertung der A3 Zellen zeigen ein sehr inhomogenes Bild. Die Fluoreszenz in mit LiCl behandelten Zellen zeigt sich zwar durchweg höher, allerdings auch in Reihen mit Inhibitor. Ein Unterschied zur nicht-behandelten Kontrolle ist nicht erkennbar. Die Balkendiagramme rechts verdeutlichen jeweils die Veränderung des Fluoreszenzsignals nach weiteren 24 Stunden, prozentual im Vergleich zur Kontrolle.

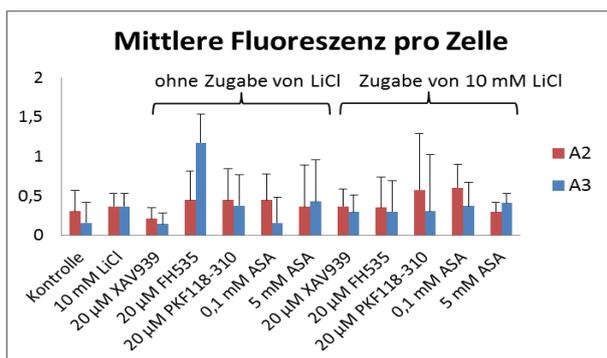
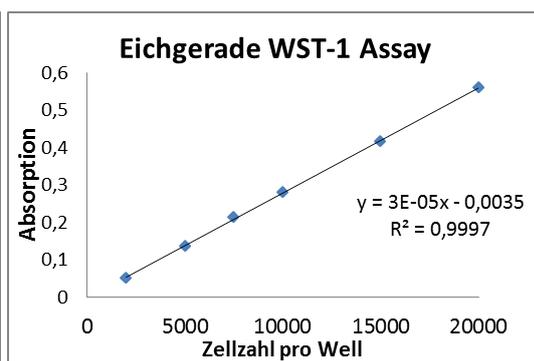
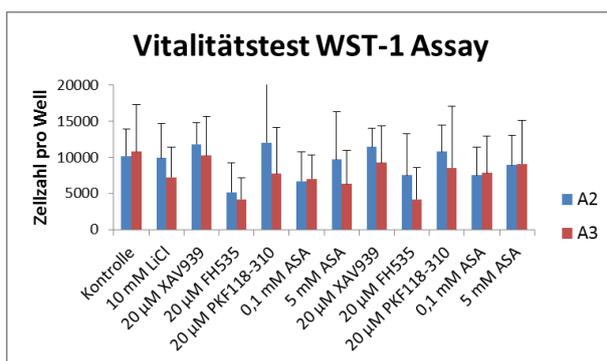


Abbildung 19: WST-1 Assay zum Nachweis der lebenden Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit Inhibitoren und LiCl (oben links) und der daraus resultierenden mittleren Fluoreszenz pro Zelle (unten). Die Eichgerade (rechts) wurde separat mit HEK293-STeneu4 A1-Zellen ausgeführt, indem die Zellen wie auch im Assay vor Messung 48 h in der Platte kultiviert wurden. Im eigentlichen Assay konnte eine wachstumshemmende Wirkung der Inhibitoren festgestellt werden, welche aber bei zusätzlicher Behandlung mit LiCl relativiert wurde.

#### 4.3.3.2. Auswertung über Mikroskopische Analyse

Die in Kapitel 4.3.3.1 ausgewerteten Assayplatten wurden neben der reinen Messung im Plattenphotometer zusätzlich noch unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und so eine zusätzliche Auswertung vorgenommen. Ziel war festzustellen, ob die Zellen HEK293-STeneu4 A2 und A3 auch für einen Assay mit optischer Auswertung geeignet sind. Die Aufnahme der Bilder erfolgte jeweils direkt nach der Messung im Photometer. Die Prozessierung der Bilder folgte wie in den Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dieser Auswertung aufgetragen: Es zeigt sich hier keine signifikante Veränderung zwischen den Bildern. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wells sind mit dieser Auswertemethode nicht darstellbar. Eine zukünftige Anwendung der Zellen in einem Assay stellt daher nur die beschriebene photometrische Bestimmung dar.

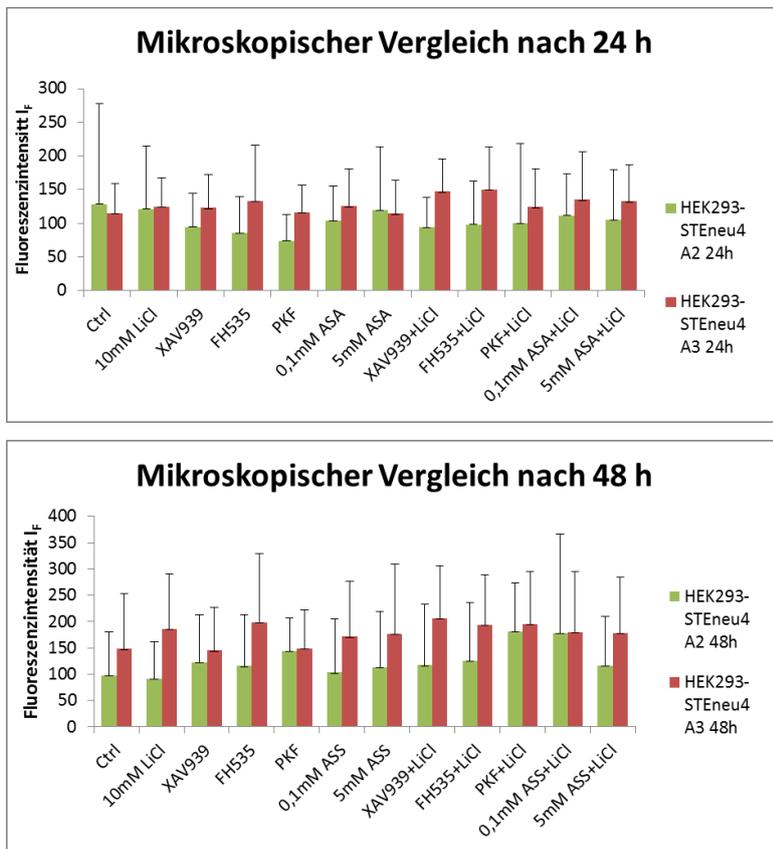


Abbildung 20: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung von HEK293-STeneu4 A2 und A3 Zellen 24 Stunden (oben) und 48 Stunden nach Zugabe der Inhibitoren und LiCl. Nach 24 Stunden ist im A2 Klon eine leicht niedrigere Fluoreszenz in mit Inhibitor behandelten Zellen erkennbar, jedoch nicht eindeutig. Der A3 Klon zeigt keinerlei Unterschied. Nach 48 Stunden ist die Fluoreszenz insgesamt höher, ein Trend ist jedoch überhaupt nicht mehr erkennbar.

### 4.3.4. Inhibitorischer Assay durch Ausbleichen und Regeneration der Fluoreszenz

#### 4.3.4.1. Zeitaufgelöste Studien

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, wurde sowohl in den mikroskopischen Analysen als auch in den Messreihen deutlich, dass der größte Effekt auf den Wnt-Signalweg innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aktivierung des Signalweges erfolgte. Daraus folgend wurden SW480-STeneu4 Zellen für das Auffinden Wnt-inhibierender Substanzen in einer zeitaufgelösten Live-Cell Imaging-Studie eingesetzt. Für die ersten Proof-of-principle Versuche wurden diese Zellen mit verschiedenen, bekannten Wnt-Inhibitoren behandelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop nacheinander punktuell mit der Fluoreszenzlampe (LED 495 nm im Nahfeld) ausgebleicht (Bleaching). Anschließend wurde der Fluoreszenz-Regenerationsprozess (Recovery) dokumentiert. Beim Auftrag der Kurven, die sich beim Ausbleichen der Fluoreszenz ergaben, wurde deutlich, dass der Prozess einem exponentiellen Verlauf folgte und unabhängig von der Zugabe von Wnt-Inhibitoren ist.

Abbildung 21 zeigt ein exemplarisches Experiment, um die Übereinstimmung der einzelnen Kurven unabhängig ihrer Behandlung zu verdeutlichen.

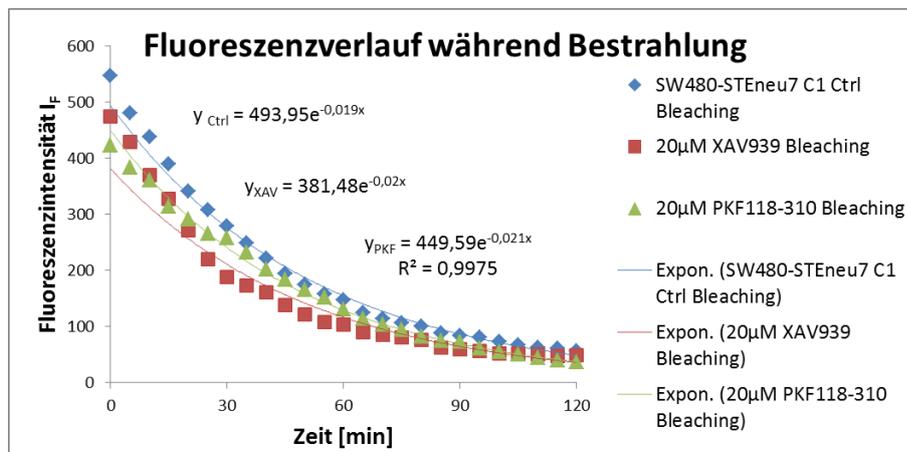


Abbildung 21: Exemplarischer Verlauf der Ausbleichkurve eines Experiments mit der Zelllinie SW480-STeneu7 C1, in dem die Zellen entweder nicht, mit 20 µM XAV939 oder mit 20 µM PKF118-310 behandelt wurden. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte punktuell jeweils zwei Stunden, bevor das nächste Well bestrahlt wurde. Dabei erfolgte alle 5 min die Aufnahme eines Bildes. Aufgetragen ist jeweils die Mittlere Gesamtfluoreszenz eines aufgenommenen, hintergrundbereinigten Bildes. Außerdem ist jeweils die Trendlinie, die sich aus den Kurven ergibt, angegeben, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden

Die Entwicklung der Fluoreszenzregeneration wurde über einen Zeitraum von 12 bzw. 24 Stunden verfolgt. Dabei wurde zunächst ein steiler Anstieg der Fluoreszenz bemerkt, der im weiteren Verlauf linear anstieg. Die Steigung dieser Geraden war dabei abhängig von der Ausgangsfluoreszenzintensität der eingesetzten Zellklone sowie der Substanz die verwendet wurde, um den Wnt Signalweg zu inhibieren. Insgesamt zeigten Zellen, welche nicht inhibiert wurden, die schnellste Recovery, was den Erwartungen entsprach. Bei höherer eingesetzter Konzentration der Inhibitoren wurde auch der

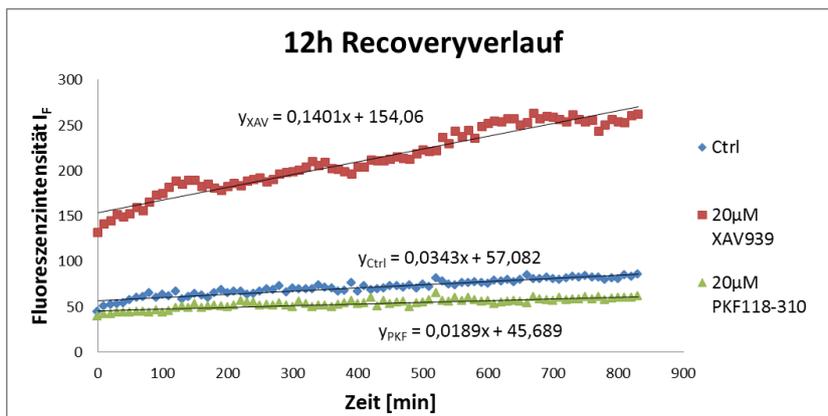
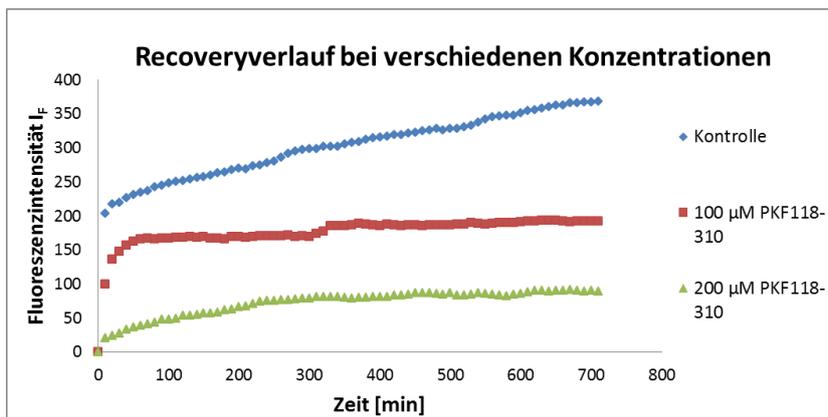
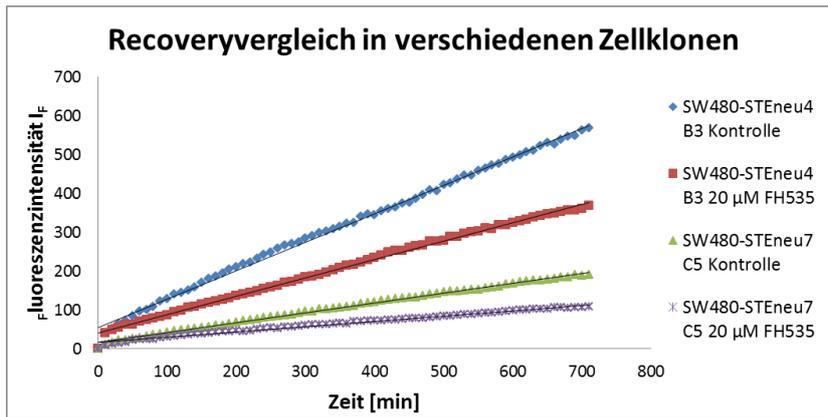


Abbildung 22: Oben: Vergleich der Recovery in SW480-STeneu4 B3 und SW480-STeneu7 C5 bei Verwendung desselben mit oder ohne 50 µM FH535 behandelt. Nach Bestrahlung der Klone wurde die Fluoreszenz dokumentiert. Aufgetragen ist die hintergrundbereinigte mittlere Gesamtfluoreszenz eines aufgenommenen Bildes über 12 h. Die Fluoreszenzregeneration zeigte sich langsamer nach Behandlung mit den Wnt-Inhibitoren, jedoch unterschiedlich in den verwendeten Klonen. Mitte: Vergleich der Recovery bei verschiedenen Konzentrationen PKF118-310 in SW480-STeneu4-Zellen. Sowohl Fluoreszenzintensität als auch Steigung sind bei höherer Konzentration deutlich vermindert. Unten: Vergleich der Fluoreszenzregeneration in SW480-STeneu7 C1 Zellen nach Behandlung mit 20 µM XAV939 oder 20 µM PKF118-310 über 12 h. Die Recovery der unbehandelten Kontrolle ist steiler als diejenige in Zellen, die mit PKF118-310-behandelte wurden. Zellen, welche mit XAV939 behandelt wurden, zeigten eine bis zu 5-fach höhere Gesamtfluoreszenz und einen fast 10-mal steileren Anstieg gegenüber dem zweiten Inhibitor.

Anstieg geringer, wobei allerdings die Substanzen XAV939, PKF118-310 und FH535 oberhalb von 50  $\mu\text{M}$  zytotoxisch wirken. Eine Ausnahme der oben genannten Beobachtung bildete XAV939 – hier wurde häufig eine fluoreszenzverstärkende Wirkung festgestellt, so dass die Fluoreszenz oft über die der unbehandelten Kontrolle hinausging (Abbildung 22). Oberhalb einer eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  war dieser Effekt aufgrund der Zytotoxizität nicht mehr zu beobachten.

#### *4.3.4.2. Endpunkt-Bestimmung*

Basierend auf den Ergebnissen und Beobachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde ein Aufbau entwickelt, mit welchem Zellen in einer 4-well-Schale simultan im Brutschrank bestrahlt werden konnten. Der Bestrahlungskasten besitzt vier Aufhängungen, mit denen die Platte so positioniert wird, dass jeweils ein Well zentral über einer 495 nm LED steht. In Vorversuchen wurde die Dauer getestet, die die Zellen unbeschadet der Strahlung und der damit einhergehenden Wärmeentwicklung ausgesetzt werden können. Dabei erfolgte die Messung der Fluoreszenz vor Bestrahlungsbeginn, direkt nach mehreren Zeitpunkten der Bestrahlung und nach weiteren 24 Stunden Recovery. Wie Abbildung 23 zeigt, konnte bereits nach einer Stunde Bestrahlung eine Reduktion der Fluoreszenz festgestellt werden, die größte Wirkung konnte nach 3,2 Stunden verzeichnet werden. Eine längere Bestrahlungsdauer wurde nicht gewählt, da bereits nach dieser Zeit aufgrund der Wärmeentwicklung der LEDs das Medium signifikant erwärmt wurde, feststellbar an der Kondensation am Plattendeckel. Nach dieser Zeit wurde die Fluoreszenz etwa um das Fünffache reduziert. Um bei gleicher Strahlungsintensität einen höheren Bleachingeffekt zu erzielen, wurden im weiteren Verlauf die 470 nm LEDs auf 405 nm LEDs gewechselt. Hier wurde beobachtet, dass bereits eine kürzere Bestrahlungsdauer einen höheren Effekt erzielte, ebenso wurde dadurch die Kondensation im Deckel reduziert.

Die Ergebnisse nach Einsatz des Wnt-Inhibitors PKF118-310 zeigen, dass in der entwickelten Bestrahlungskammer bei 405 nm eindeutig zwischen behandelter und nicht-behandelter Zellen unterschieden werden kann: Nach 3 Stunden Bestrahlungsdauer im Brutschrank zeigten alle Wells eine ähnliche Reduktion ihrer Fluoreszenz. Nach weiteren 24 Stunden Regenerationsphase zeigten nur die Kontrollzellen ohne Wnt-Inhibitor eine Recovery, während inhibierte Zellen in etwa denselben Fluoreszenzlevel wie direkt nach dem Bleichvorgang beibehielten.

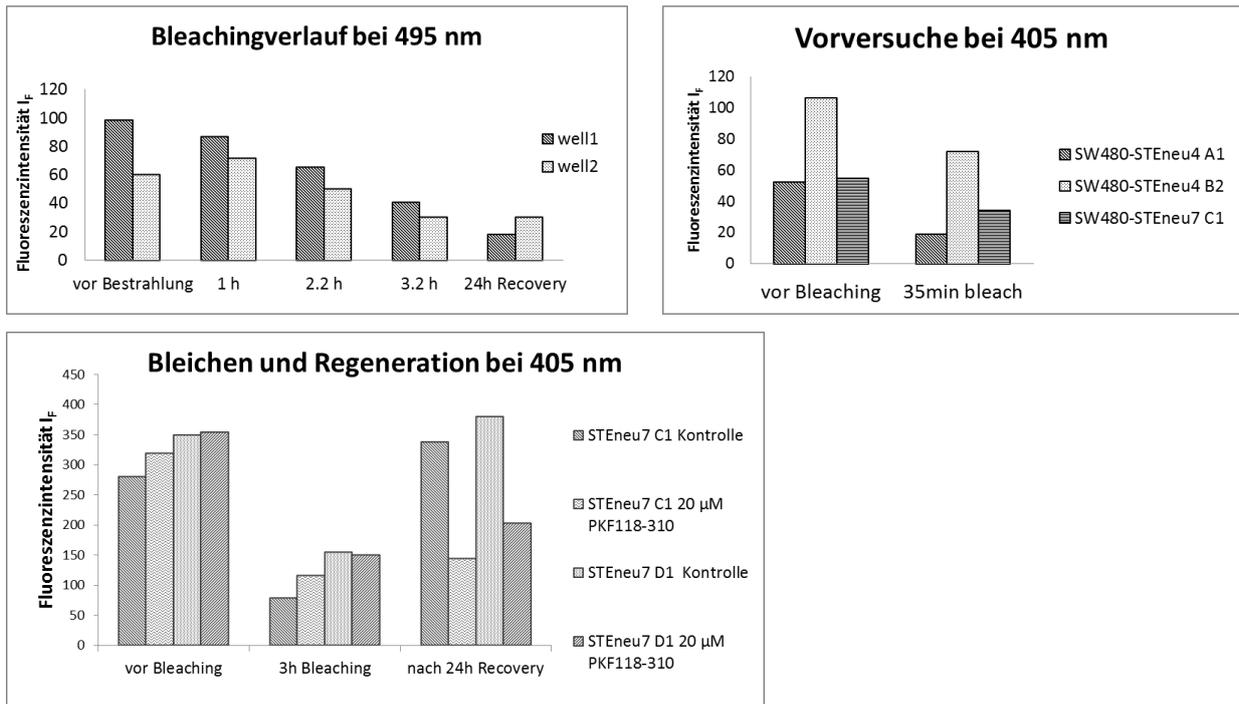


Abbildung 23: Oben links: Bestimmung der Bestrahlungsdauer in der Bestrahlungskammer bei 495 nm. Verwendet wurden HEKT-EGFPA1 Zellen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte jeweils mikroskopisch nach den angegebenen Zeitpunkten. Die letzte Angabe bezeichnet die Fluoreszenz nach 24 Stunden Recoveryzeit. Oben rechts: Bestrahlung mehrerer Zellklone in derselben Bestrahlungskammer, aber bei 405 nm. Eine Reduktion der Fluoreszenz ist bereits bei 35 min Bestrahlung erkennbar.

Unten: SW480-STEneu7 C1 und D1 wurden jeweils mit 20 μM PKF118-310 behandelt und bei 405 nm in der Kammer für 3 h bestrahlt, nach weiteren 24 Stunden Regenerationsphase die Fluoreszenz erneut gemessen. Die unbehandelte Kontrolle zeigte dabei eine Verdopplung der Fluoreszenz gegenüber dem Wert direkt nach Bestrahlung, während die Fluoreszenz der inhibierten Zellen unverändert blieb.

#### 4.4. Testsysteme für das Live-Cell Imaging des Wnt-Signalwegs in transfizierten Zellen

Um in Zellen den Aktivierungsverlauf des Wnt-Signalweges verfolgen zu können, wurden mehrere Reportergerkonstrukte erstellt, welche auf einem mit  $\beta$ -Catenin fusionierten Reporterprotein basieren. Die einzelnen Vektoren wurden in unterschiedliche Zelllinien transfiziert und hinsichtlich ihrer Handhabung und Erkennbarkeit einer  $\beta$ -Catenin-Translokation beurteilt. Im Folgenden werden die Ergebnisse für jedes der Reportergerkonstrukte beschrieben.

##### 4.4.1. *pBcat-mcherry*

Das Vektorkonstrukt *pBcat-mcherry* wurde sowohl in HEKB Zellen als auch in MDCK Zellen zur Transfektion eingesetzt. Aufgrund der schwierigen Transfizierbarkeit der Zelllinie MDCK wurde der Vektor hier ausschließlich stabil transfiziert. Transfektionen und Untersuchungen in HEKB-Zellen erfolgten sowohl stabil als auch transient.

#### 4.4.1.1. *Transfektion in MDCK-Zellen*

Während und nach dem Selektionsprozess mit Geneticin konnte in einigen Klonen eine deutliche Konzentration einer schwachen orangenen Fluoreszenz an der Zellmembran der Zellen beobachtet werde. Andere Zellkolonien wiesen eine intensive, komplette Rotfärbung auf. Nach Abschluss der stabilen Transfektion wurden die verschiedenen MDCK- $\beta$ cat-mCherry Klone entweder mit LiCl (1 mM, 10 mM) oder mit Wnt3a (20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) behandelt. In keinem der Experimente konnte ein Unterschied in der Lokalisation der Fluoreszenz erkannt werden. Im Verlaufe Kultivierung der MDCK- $\beta$ cat-mCherry-Zellen wurde sukzessive eine verminderte Anzahl fluoreszierender Zellen festgestellt. Nach 23 Passagen konnte das Fusionsprotein nicht mehr über PCR in der Zelllinie nachgewiesen werden.

#### 4.4.1.2. *Transfektionen in HEB-Zellen*

HEKB Zellen, welche mit dem Reporter-genkonstrukt transfiziert wurden, konnten sowohl erfolgreich stabil als auch transient transfiziert werden. Auch hier ließ das Fluoreszenzsignal mit fortschreitender Kultivierung nach. Das Signal verteilte sich diffus und konnte nicht mehr exakt lokalisiert werden. Das Reporterkonstrukt konnte nach 30 Passagen noch über PCR nachgewiesen werden.

Untersuchungen des p $\beta$ catenin-mCherrys erfolgten nach ersten Tests in HEK293T-Zellen ausschließlich in stabil transfizierten HEKB-Zellen. Vorversuche in transient transfizierten Zellen zeigten zwar eine starke Fluoreszenz, die Expression des Fusionsproteins direkt nach der Transfektion war jedoch deutlich vermindert (optisch 30 %) gegenüber der transfizierten Positiv-Kontrolle pmCherry-N1 (annähernd 100 %) und in der Ausprägung der Kultur sehr heterogen.

Nach erfolgreicher stabiler Transfektion wurde der Wnt-Signalweg in HEKB- $\beta$ catenin-mCherry-Zellen entweder aktiviert mit LiCl (2 mM und 10 mM) oder mit Acetylsalicylsäure (ASS; 3 mM und 5 mM) inhibiert. Dabei sollte eine Lokalisationsveränderung der Fluoreszenz gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen analysiert werden. Die Dokumentation erfolgte zehn Minuten nach Zugabe der Substanzen, 24 und 48 Stunden. Dabei ergab sich das in Abbildung 24 erhaltene Muster. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten über den beobachteten Zeitraum keine Lokalisationsveränderung der Fluoreszenz. Die Expression des Fluoreszenzproteins war insgesamt sehr schwach, nur Zellen, die sich von der Kulturoberfläche „abkugelten“, zeigten ein deutlich erhöhtes Signal, welches sich gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilte. Zellen mit geringerer Fluoreszenzintensität exprimierten das Fusionsprotein gleichmäßig im Zytoplasma, im Zellkern war keine Fluoreszenz sichtbar. Die Zugabe von LiCl beider Konzentrationen bewirkte nach 24 Stunden eine generelle Verstärkung der Fluoreszenz, ebenso zeigten mehr Zellen ein Signal über die ganze Zelle, inklusive Zellkern. Dieser Effekt war 48 Stunden nach Zugabe nicht mehr zu erkennen; stattdessen bildeten sich *inclusion bodies* mit dem Fusionsprotein (2 mM LiCl) oder die Zellen zeigten gar kein Signal (10 mM LiCl).

Zellen, welche mit 3 mM ASS behandelt wurden, zeigten ab dem ersten Beobachtungspunkt bis 24 Stunden nach Zugabe eine partielle Lokalisationsänderung der Fluoreszenz vom Zytoplasma hin zur Zellmembran. Nach weiteren 24 Stunden war das Fusionsprotein weiterhin an der Zellmembran lokalisiert, zusätzlich zeigten einige Zellen ein punktiertes Signal innerhalb der Zelle an der Position des Zellkerns, jedoch nicht in dessen Größe. Bei Erhöhung der ASS-Konzentration auf 5 mM wurden ähnliche Beobachtungen gemacht; insgesamt war das Fusionsprotein gleichmäßig in der Zelle verteilt.

Die Stärke des Signals in stabil transfizierten Zellen verringerte sich im Laufe der Kultivierung stark, ebenso zeigten immer weniger Zellen ein Signal, sodass keine weiteren Analysen über die Beschriebenen hinaus möglich waren.

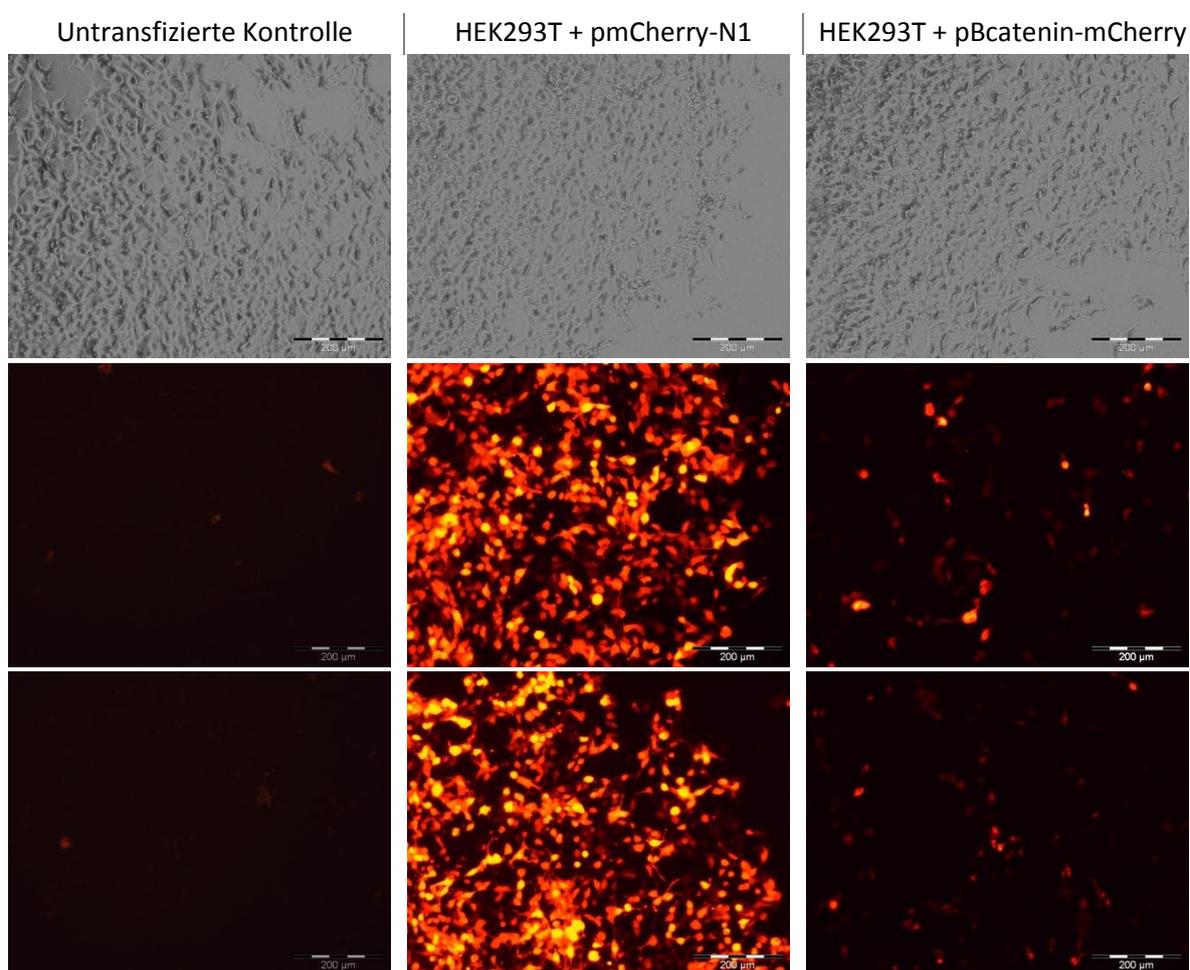


Abbildung 24: Evaluierung des Transfektionserfolges von pBcatenin-mCherry in HEK 293T Zellen. Obere Reihe: Phasenkontrast des Zellrasens 24 Stunden nach Transfektion; Mittlere Reihe: Fluoreszenzaufnahmen 24 Stunden nach Transfektion; untere Reihe: Fluoreszenzaufnahmen 48 Stunden nach Transfektion. Vergrößerung: 100-fach

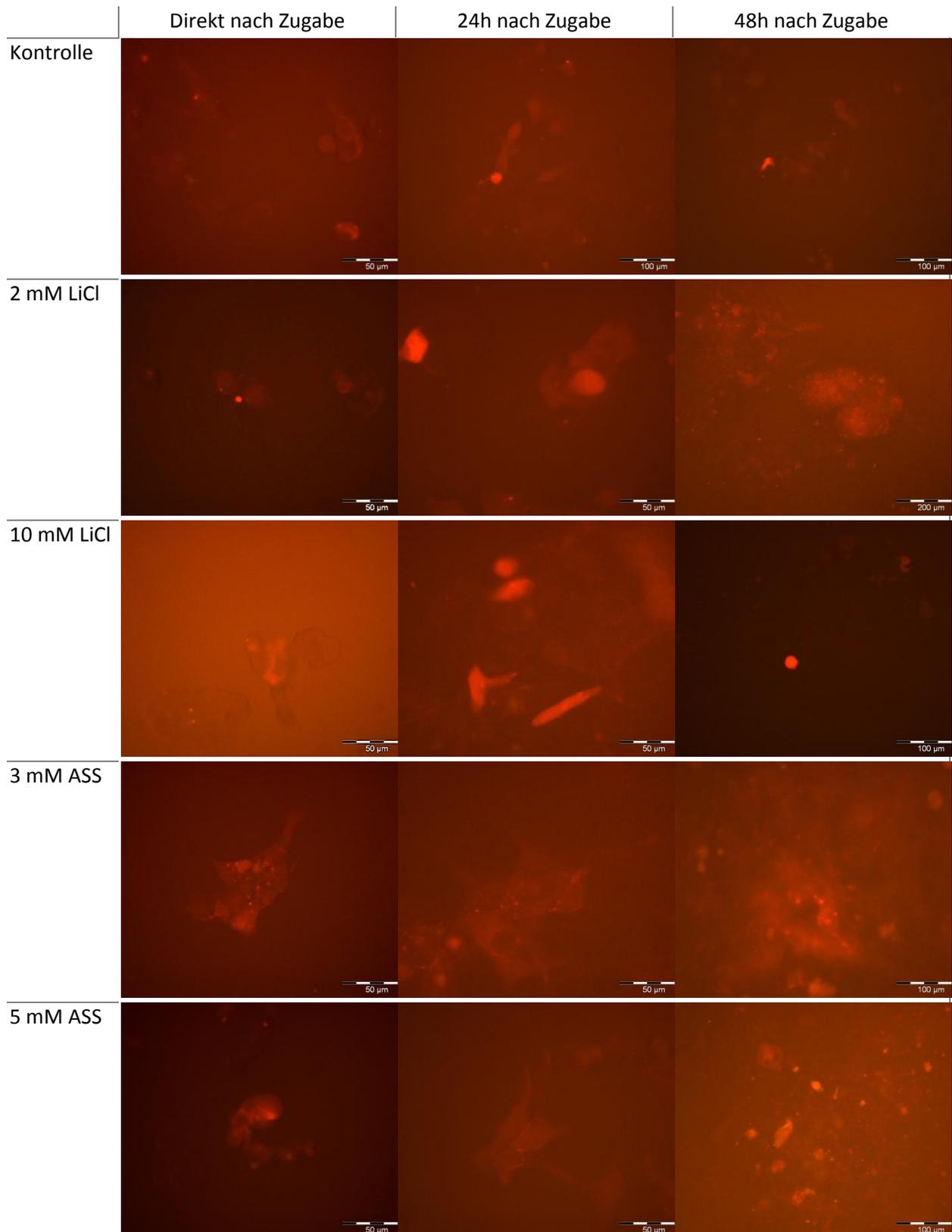


Abbildung 25: Vergleich von HEKB- $\beta$ catenin-mCherry-Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden Behandlung mit verschiedenen, Wnt-Signalwegs-modulierenden Substanzen. Ein eindeutiger Effekt auf die Lokalisation der Fluoreszenz ist nach 24 Stunden erkennbar; weitere Beschreibungen s. Text. Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Olympus aufgenommen, die Vergrößerung der einzelnen Aufnahmen ist angegeben.

#### 4.4.2. *pBcatenin-eGFP*

Der erzeugte pBcatenin-eGFP Vektor wurde in die Zelllinie HEK 293 transfiziert, um einerseits die Verteilung von  $\beta$ -Catenin in verschiedenen Aktivitätszuständen des Wnt-Signalweges in der lebenden Zelle beobachten zu können, andererseits auch eine quantitative Aussage über die Stärke des Fluoreszenzsignals treffen zu können. Hierfür wurde ein ELISA-Photometer verwendet, welches in der Lage war, grüne Fluoreszenz in 96-Well-Platten zu messen. Im weiteren Verlauf des Versuchs sollte der Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die Aktivität des Wnt-Signalweges getestet und analog zum Vektor von pBcatenin-mCherry die Zuverlässigkeit des Vektors als Reportergenkonstrukt geprüft werden. Die Expression des Reporterproteins in transient transfizierten HEK 293 Zellen war deutlich höher gegenüber der Verwendung des pBcatenin-mCherry. Da sich die stabile Transfektion jedoch ebenfalls als problematisch erwies (siehe Kapitel 4.2.3.), wurden die Analysen in transient transfizierten Zellen durchgeführt.

Im Unterschied zu mit pBcatenin-mCherry transfizierten Zellen konzentrierte sich die grüne Fluoreszenz bei allen Zellen deutlich im Zellkern. Zusätzlich wurde bei einigen Zellen ein vermindertes Fluoreszenzsignal an der Zellmembran oder im Zytoplasma beobachtet. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen, Wnt-Signalwegs-modulierenden Substanzen behandelt und dabei auf die Veränderung der Fluoreszenz in der Zelle nach einer Stunde und nach 24 Stunden geachtet. Als Inhibitoren wurden der Tankyraseinhibitor XAV939, der  $\beta$ catenin-Inhibitor FH535, der Tcf4/ $\beta$ catenin-Komplex-Inhibitor PKF118-310 (alle jeweils in der Konzentration 20 $\mu$ M) und Acetylsalicylsäure (1 mM) verwendet. Insgesamt konnte bei allen verwendeten Inhibitoren festgestellt werden, dass sich bereits nach einer Stunde Inkubation die Fluoreszenz vom Zellkern hin zum Zytoplasma und der Zellmembran verschob. Die Konzentration im Zellkern war noch vorhanden, die umliegende Fluoreszenz verstärkte sich jedoch. Dieser Effekt war am stärksten in mit ASS behandelten Zellen; hier zeigte sich teilweise gar keine Fluoreszenz mehr im Zellkern. Vierundzwanzig Stunden Inkubationszeit bewirkten eine differenziertere Reaktion der einzelnen Inhibitoren: Während XAV939-behandelte Zellen sowohl zellkern-lokalisierte als auch vermehrt membranständige Fluoreszenz zeigten, verursachte FH535 zwar eine Verschiebung der Fluoreszenz zusätzlich zum Zellkern in das Zytoplasma, jedoch nicht an die Zellmembran. PKF118-310- und ASS-behandelte Zellen hingegen zeigten fast ausschließlich eine Fluoreszenz im Zellkern. Insgesamt war die Veränderung jedoch nicht sehr prägnant.

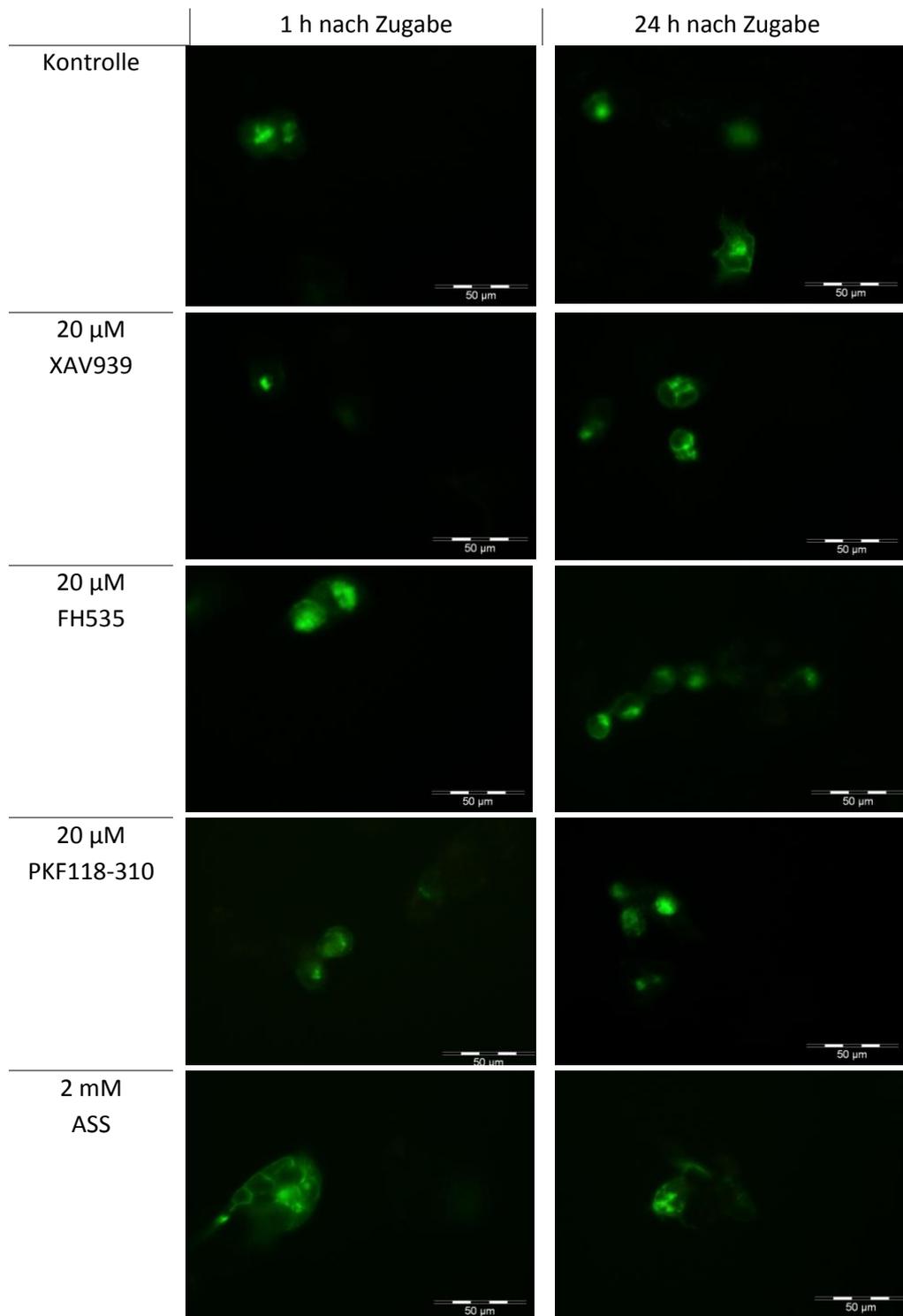


Abbildung 26: Wnt-Signalwegsinhibierungen in HEK 293-Zellen, die transient mit dem Reportervektor p $\beta$ catenin-EGFP transfiziert wurden. Aufgrund der Beobachtungen in HEK $\beta$ cat-mCherry –Zellen wurde der Beobachtungszeitraum auf 24 Stunden eingeschränkt. Die deutlichste Veränderung zeigte die Zugabe von 2 mM Acetylsalicylsäure 1 Stunde nach Zugabe. Insgesamt waren die Beobachtungen sehr diffus. Weitere Beschreibungen im Text. Aufnahme der Bilder am Olympus Mikroskop, Vergrößerung 400-fach.

#### 4.4.3. *pBcatenin-SNAP-tag*

Nach transienter Transfektion des Vektors pBcat-SNAP-tag in HEK293T-Zellen wurde die klonierte SNAP-Sequenz nach Herstellerangaben gefärbt. Entgegen der erwarteten Rotfärbung konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche gelbe Fluoreszenz festgestellt werden. Die Färbefizienz betrug optisch annähernd 100 %. Auch noch 48 Stunden nach Färbung wurde unter dem Mikroskop eine deutliche Fluoreszenz registriert. Um die Effizienz des Vektors zu testen, wurden die transfizierten und gefärbten Zellen nach 24 Stunden mit 50 ng/ml Wnt3a Protein behandelt, um eine Translokation der Fluoreszenz in den Zellkern zu beobachten. Es konnte allerdings kein Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle erkannt werden. Zusätzlich wurden HEK 293T mit dem dem pSNAPf-Kit mitgelieferten Positiv-Kontrollvektor pSNAP-COX2A transfiziert und ebenfalls wie beschrieben behandelt. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen. Es konnte im Färbemuster jedoch auch keine Abweichung gegenüber den mit pBcat-SNAP-tag transfizierten Zellen erkannt werden.

Da auch die untransfizierten Kontrollzellen nach Färbung eine starke gelbe Fluoreszenz zeigte, konnte nicht von einer spezifischen Färbung ausgegangen werden. Infolgedessen wurde der Vektor nicht in weiteren Experimenten genutzt. Im Ergebnis ist dieses Vektorkonstrukt nicht für die Visualisierung des Wnt-Signalwegs geeignet.

#### 4.5. Nachweis der Wirksamkeit Wnt-Signalwegs-modulierender Substanzen durch Morphologieänderungen von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen zeigen ein platten- oder kachelförmiges Aussehen und wachsen sehr schnell und dicht in adhärenter Kultur. Bei dichterem Wachstum sind die Zellen kleiner, ohne ihr kachelförmiges Aussehen zu verändern. Während der Transfektion von MDCK-Zellen mit  $\beta$ -catenin-mCherry und nachfolgender Behandlung mit Wnt-modulierenden Substanzen war auffällig, dass sich die Zellen in ihrer Morphologie veränderten. Daraufhin wurde ein Test entwickelt, wonach MDCK-Zellen als Reporterzellen für den Wnt Signalweg genutzt werden könnten. Zur Validierung von Morphologie-Veränderungen im Zusammenhang mit Wnt-Signalwegsänderungen wurden sowohl Kontrollzellen sowie unterschiedlich stabil transfizierte MDCK-Zellen in 24-Well-Platten kultiviert mit 5 mM ASS und 10 mM LiCl behandelt und über einen Zeitraum von insgesamt einer Woche beobachtet. Ein Medienwechsel mit oder ohne Zusatz der genannten Substanzen erfolgte alle zwei Tage. Nachfolgend werden die Morphologieänderungen für die genutzte Zelllinien MDCK, MDCK- $\beta$ catenin-mCherry, MDCK-cRaf-EGFP betrachtet.

#### 4.5.1. MDCK untransfiziert

Nach Zugabe von 5 mM ASS starben optisch 90% der Kontrollzellen sofort ab, die Verbliebenen erholten sich im Laufe der beobachteten Zeit nur langsam. LiCl wirkte wachstumshemmend auf die MDCK-Kontrollzellen. Erst nach einer Woche war hier ein Zellrasen zu beobachten, der jedoch insgesamt weniger dicht war als der von unbehandelten Zellen. Ein Effekt auf die Morphologie der Zellen war eine Woche nach Zugabe von ASS zu sehen, jedoch nur marginal nach Zugabe von LiCl: Die Zellen schienen vergrößert und zeigten Ausläufer. Sie wuchsen nicht mehr in ihrer typisch gedrungenen, plättchenartiger Weise.

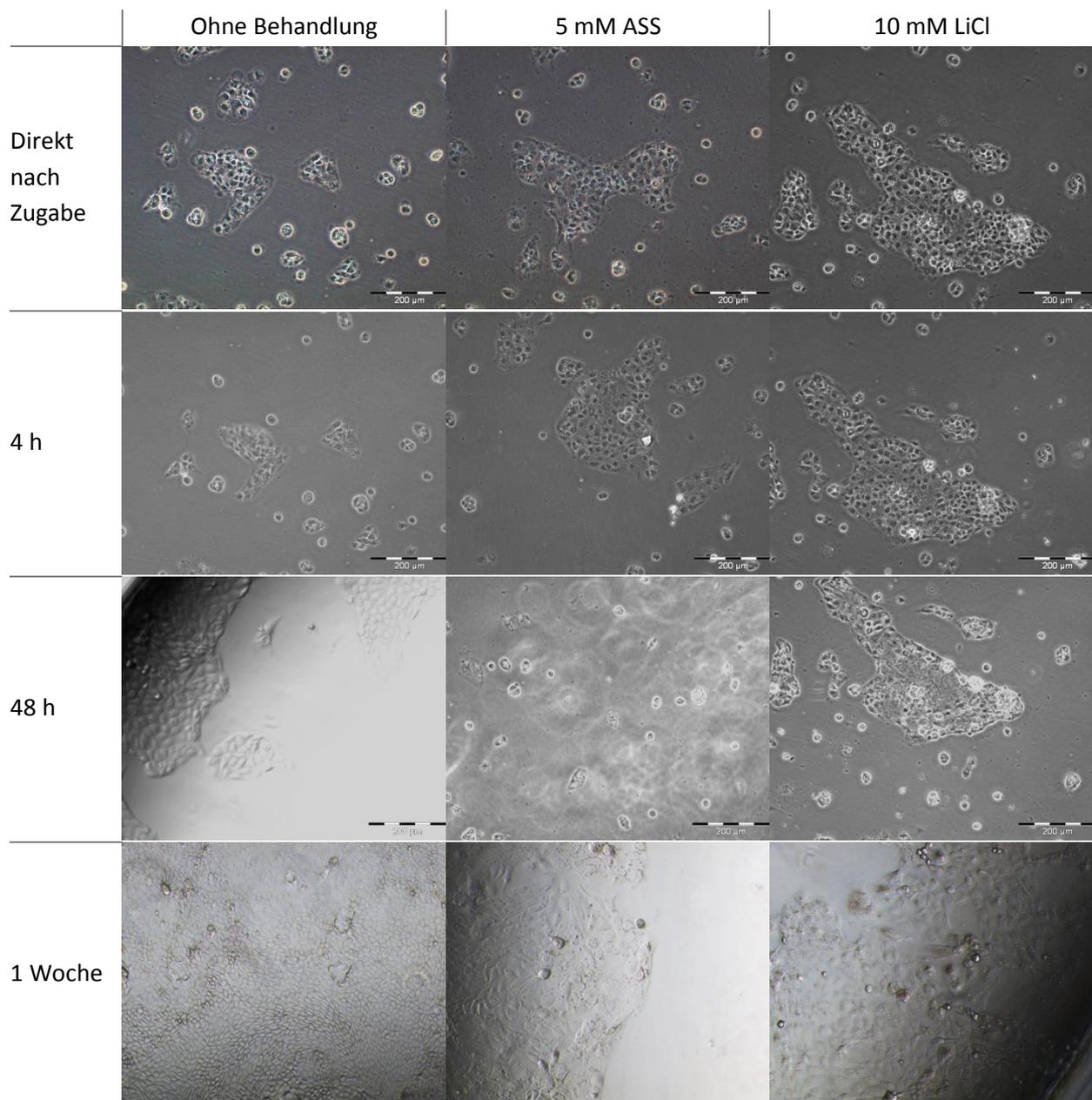


Abbildung 27: Vergleichende Aufstellung der Wirkung von ASS oder LiCl auf die Morphologie von MDCK-Zellen. Es wurde beobachtet, dass beide Reagenzien in der verwendeten Konzentration zum Zellsterben führten, die Zellen sich aber innerhalb einer Woche wieder erholten. Unter den gegebenen Umständen wurde kein Effekt auf die Morphologie festgestellt. Vergrößerung der Aufnahmen: 1:200

#### *4.5.2. MDCK- $\beta$ catenin-mCherry*

Bei Betrachtung der MDCK- $\beta$ -catenin-mCherry konnte kein Effekt beider Substanzen auf die Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden, ebenso wenig auf die Fluoreszenz der Zellen; weder änderte sich die Intensität, noch die Lokalisation der Fluoreszenz. Es war jedoch auffällig, dass ausschließlich MDCK- $\beta$ -catenin-mCherry-Zellen nicht sofort nach Zugabe von 5 mM ASS starben. Vierundzwanzig Stunden nach Substanzzugabe konnte bereits eine leichte Veränderung der Zellgestalt wahrgenommen werden – ASS-behandelte Zellen waren insgesamt größer, LiCl-behandelte Zellen bildeten an ihrem Zellrasenende kleine Ausläufer. Diese Beobachtung verstärkte sich nach 48 Stunden, wobei der Zellrasen so dicht wuchs, dass sich einige Zellen bereits ablösten. LiCl-behandelte Zellen waren morphologisch nicht mehr als MDCK-Zellen zu erkennen. Nach einer Woche unter Einfluss der Substanzen konnte keine Auswirkung von ASS auf die Zellmorphologie mehr erkannt werden, aber noch die von LiCl wie beschrieben.

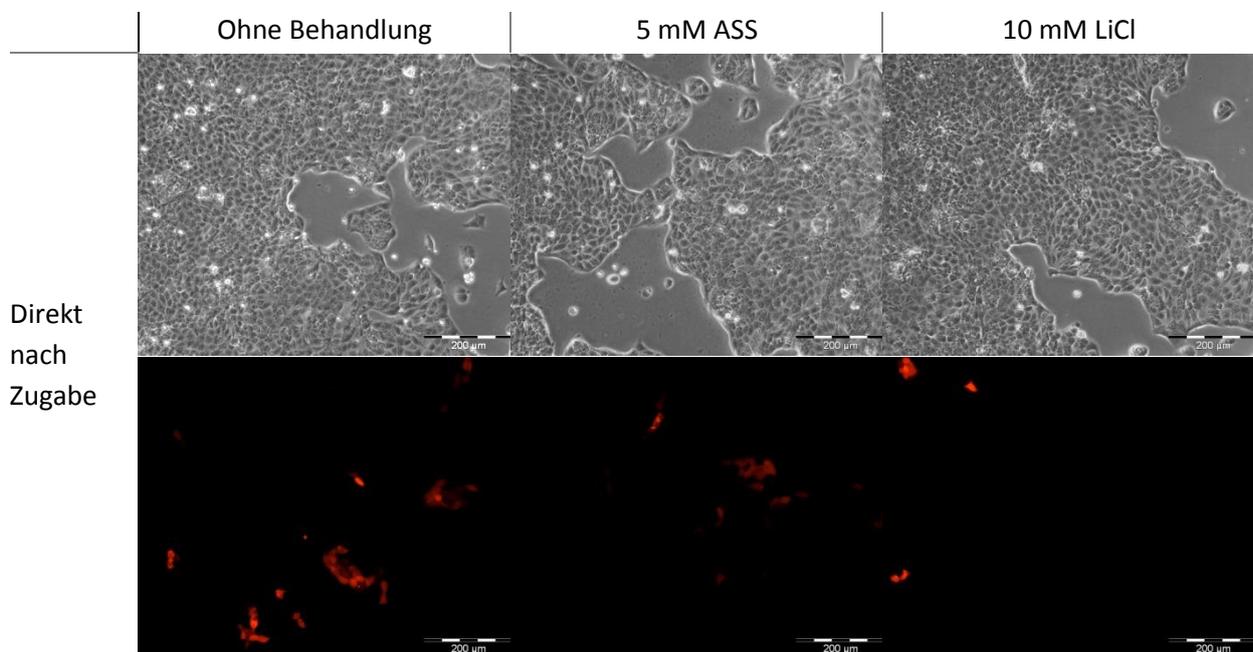
#### *4.5.3. MDCK-F3 untransfiziert*

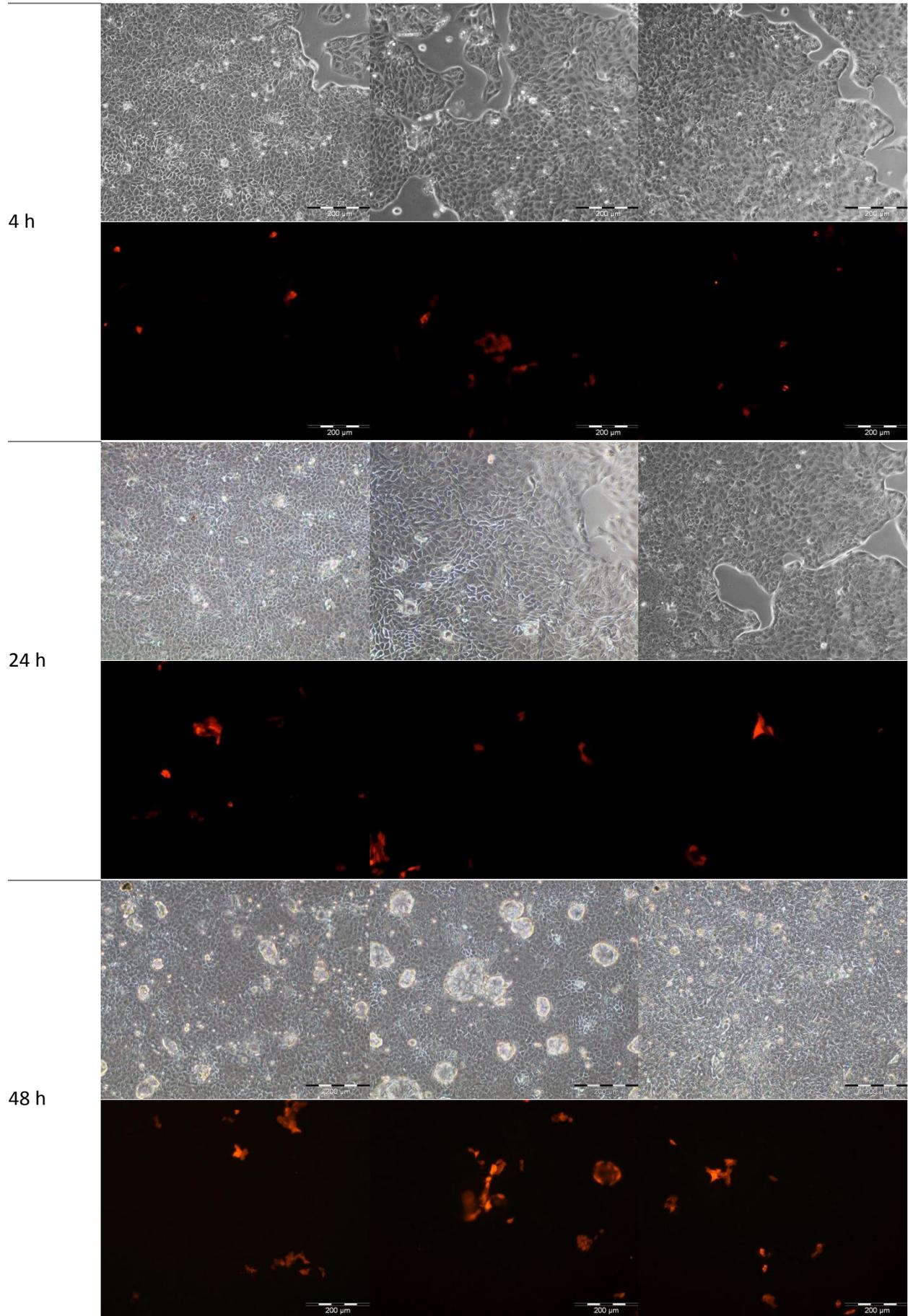
MDCK-F3-Zellen haben, anders als die untransfizierten MDCK-Zellen, eine langgezogene Zellgestalt, sodass der Zellrasen nicht kompakt, sondern eher locker wächst. Erst ab 120 h Beobachtung wurde die Zellzahl in den Platten so hoch, dass die Zellen kompakter und annähernd do mosaikartig wie untransfizierte MDCK-Zellen wuchsen. MDCK-F3 Zellen, welche mit 5 mM ASS und 10 mM LiCl behandelt wurden, veränderte ihre Zellgestalt nach 48 Stunden derart, dass zwar die längliche Zellgestalt erkennbar war, die Zellen im Rasen aber ineinander wuchsen und teilweise Ausläufer bildeten. Der Zellkörper wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zellen dicker. Nach 120 Stunden zeigten ASS-behandelte Zellen noch immer eine längliche Zellform, der Zellrasen war jedoch weit auseinander gezogen und nicht geschlossen. LiCl-behandelte Zellen zeugten ebenfalls einen nicht geschlossenen Zellrasen, konnten morphologisch aber eher den kompakten MDCK-Zellen zugeordnet werden. Nach insgesamt einer Woche Beobachtung zeigten sowohl die unbehandelten wie die mit LiCl-behandelten MDCK-F3-Zellen aufgrund ihres dichten Wachstums die kompakte Zellform von MDCK-Zellen, während ASS-behandelte Zellen größer und mehr ineinander wuchsen. Insgesamt wuchsen LiCl-behandelte Zellen langsamer als nicht- oder mit ASS-behandelte Zellen. Bei Teilen der Versuche wurde ein cytotoxischer Effekt direkt nach Zugabe von LiCl beobachtet.

#### *4.5.4. MDCK-cRaf-mCherry*

In Raf-mCherry-transfizierten MDCK-Zellen konnte die Morphologieveränderung sehr deutlich beobachtet werden. Zu allen Zeitpunkten wuchsen die unbehandelten Zellen in einem relativ gleichmäßigen Rasen, der mit höherer Zelldichte regelmäßiger erschien. Die Fluoreszenz verteilte sich in der gesamten Zelle. Sobald 5mM ASS zu den Zellen gegeben wurde, starben diese fast

augenblicklich. Lediglich eine Rest-Fluoreszenz konnte in den verbliebenen Zelltrümmern erkannt werden. Am Rand der Kulturschalen überlebten einige Zellen, die 48 h nach ASS-Zugabe wieder anfangen zu wachsen. Die Morphologie hier ähnelte nicht MDCK-Zellen, da sie Ausläufer bildeten und nicht, wie bei MDCK üblich, in Kolonien, sondern einzeln wuchsen. Die Fluoreszenz konzentrierte sich vor allem im Cytosol und wurde Richtung Zellmembran weniger. Insgesamt erschienen ASS-behandelte Zellen auch nach einer Woche größer als unbehandelte cRaf-mCherry-transfizierte Zellen und behielten ihr MDCK-untypisches Erscheinungsbild. Nach Zugabe von LiCl zu den Zellen zeigte sich bereits nach 4 h eine Veränderung der Fluoreszenz derart, dass diese sich nun mehr innerhalb der Zelle konzentrierte und nicht gleichmäßig wie in den unbehandelten Zellen verteilte. Dies war bis 48 h nach LiCl-Zugabe zu beobachten, wo sie sich wieder gleichmäßiger verteilte. Allerdings konnte ab diesem Zeitpunkt eine deutliche Veränderung der Zellgestalt erkannt werden – die Zellen wuchsen weiterhin in Kolonien, jedoch in länglicherer Form, teilweise mit Ausläufern.





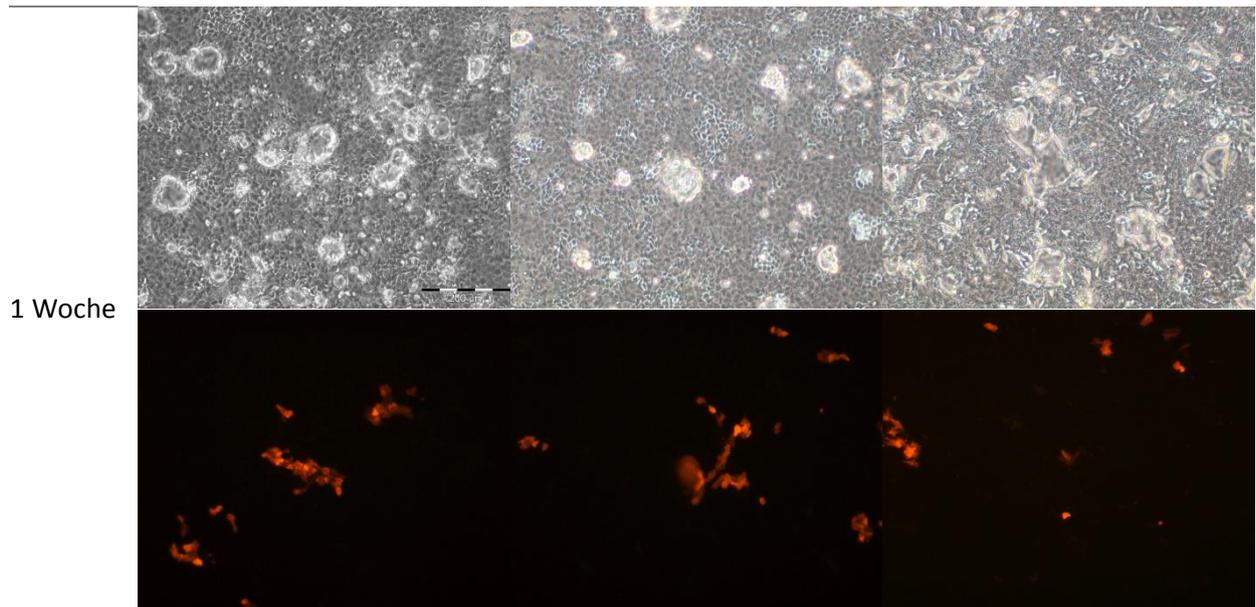
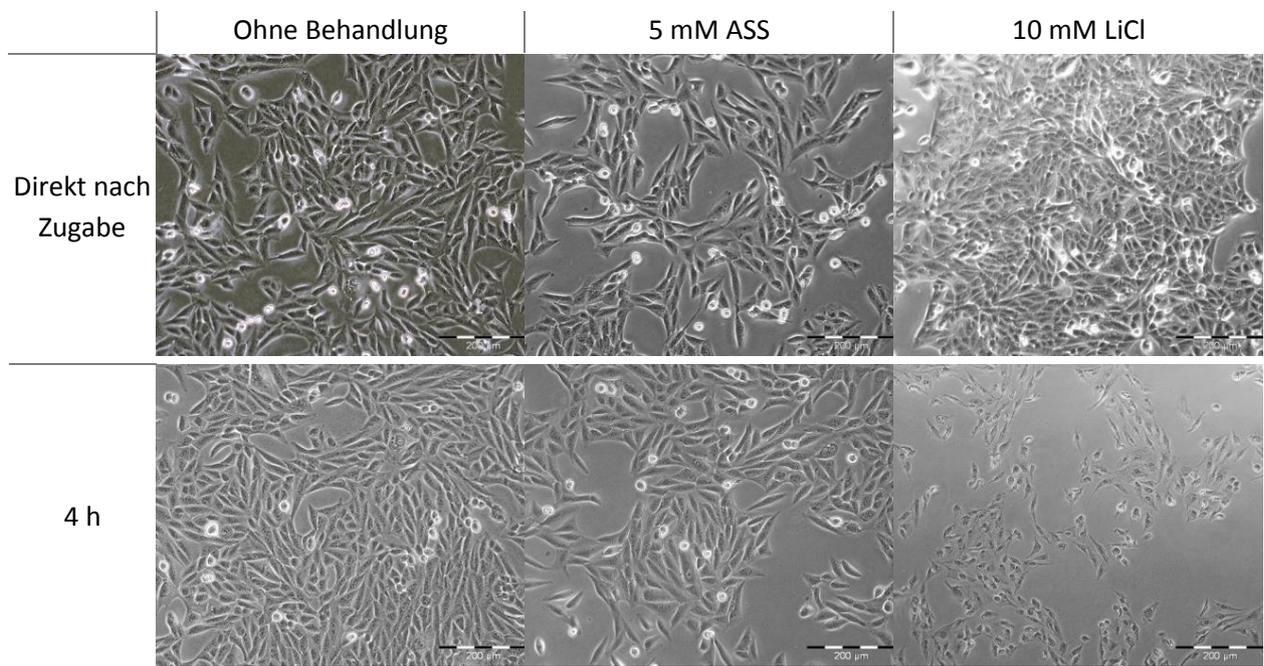


Abbildung 28: Stabil transfizierte MDCK- $\beta$ catenin-mCherry- Zellen beobachtet über einen Zeitraum von einer Woche im Vergleich: unbehandelt (links), behandelt mit 5 mM ASS oder 10 mM LiCl. LiCl verändert die Morphologie der genutzten Zellen derart, dass diese keinen geordneten Zellrasen mehr bildeten, sondern eher länglich ineinander wuchsen. Die Zellen, die mit ASS behandelt wurden, zeigten bis 14 Stunden der beobachteten Zeit eine größere Zellgestalt als die Kontrollzellen. Vergrößerung 1:100



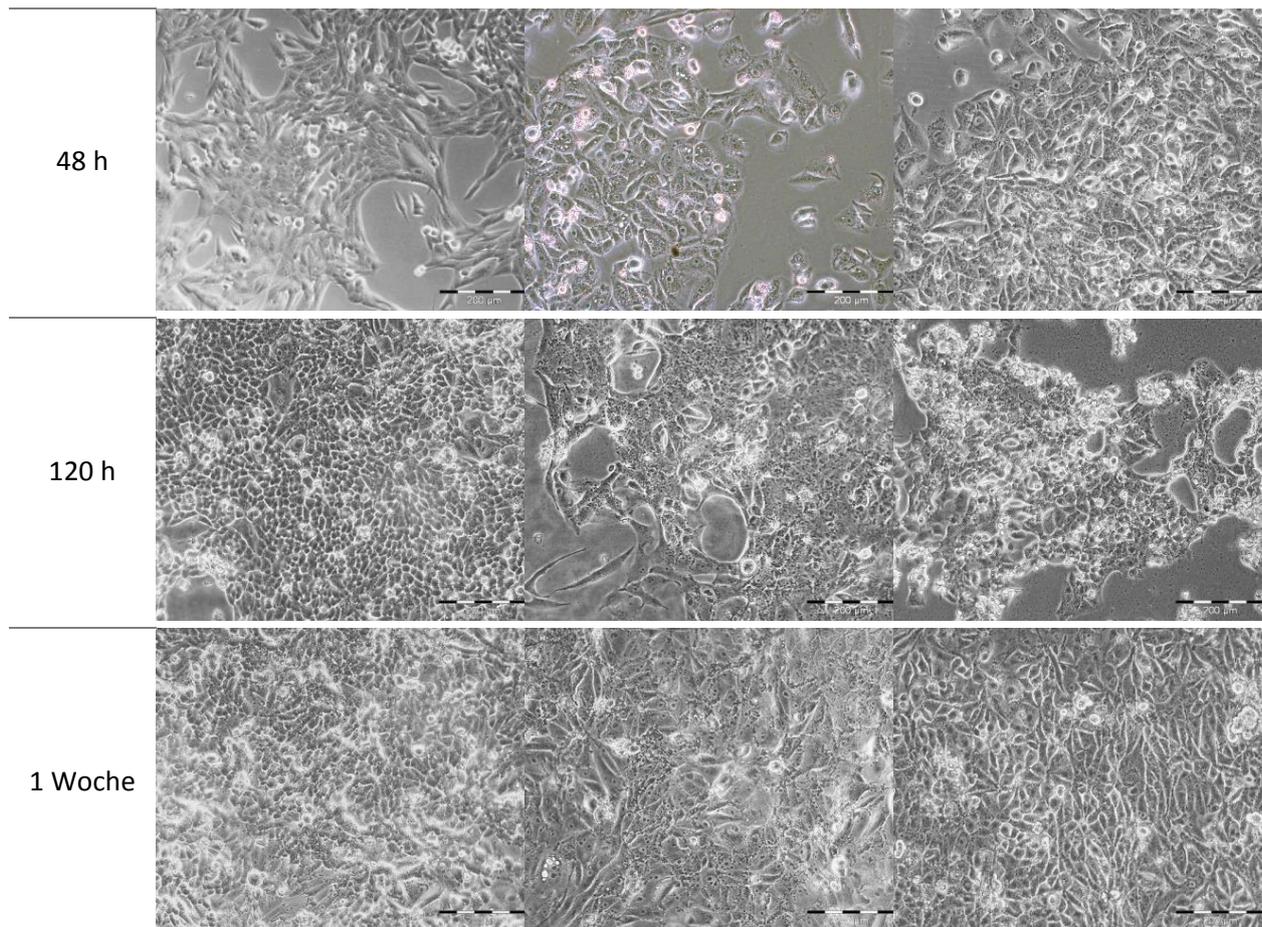
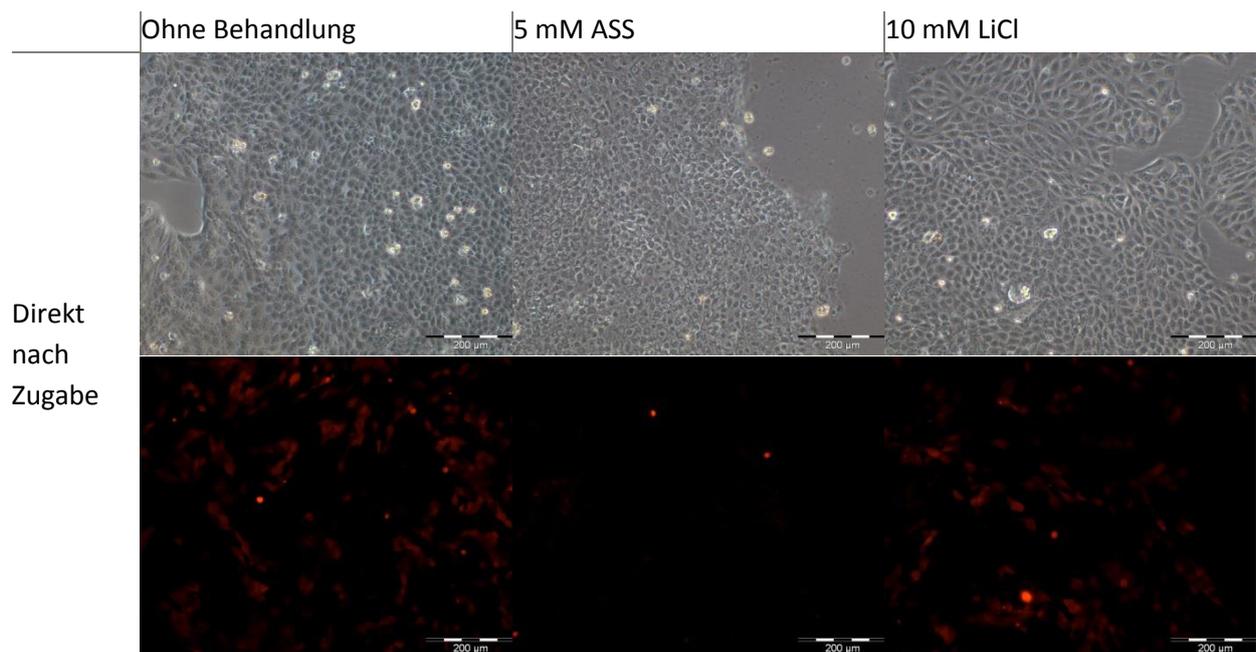
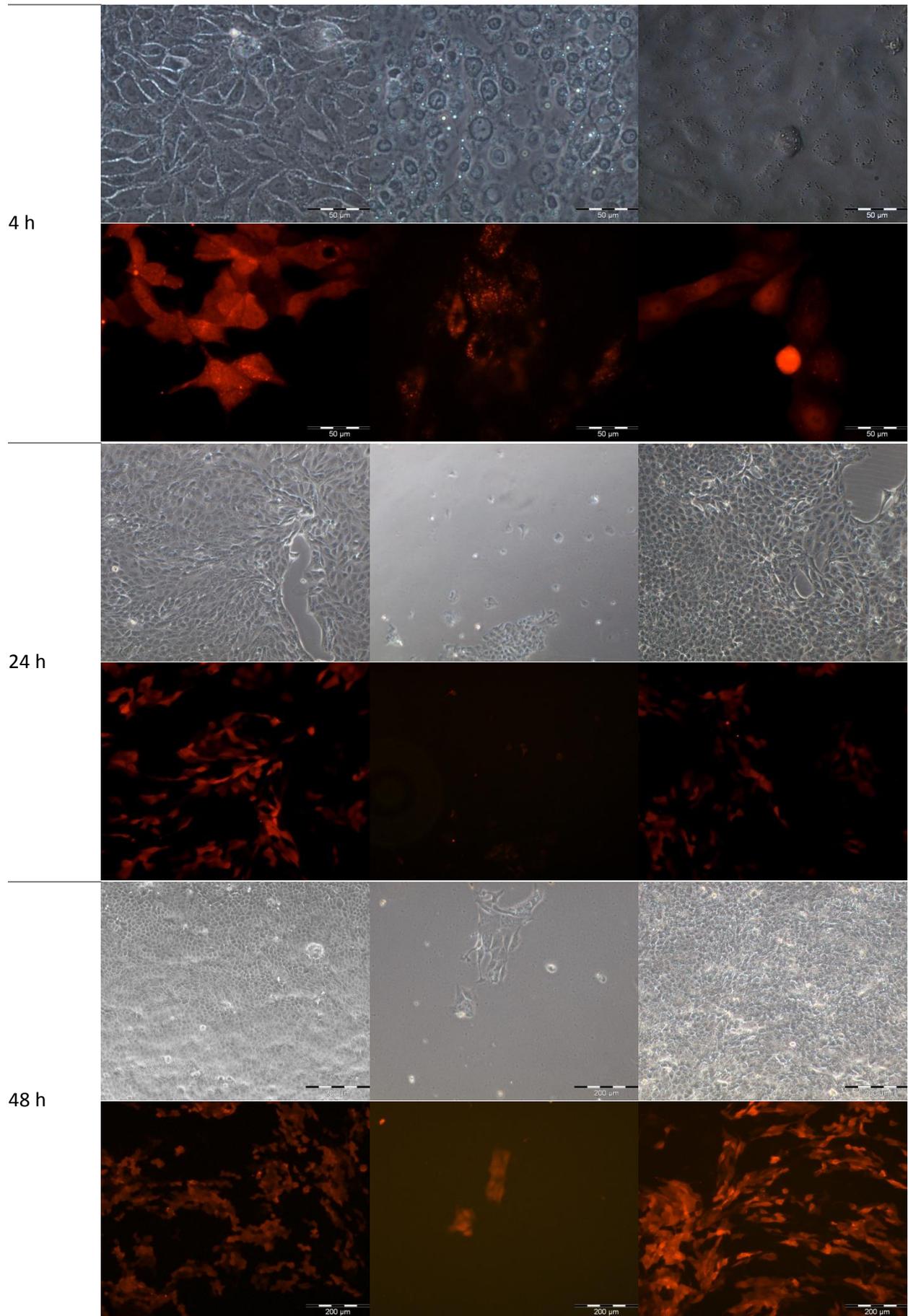


Abbildung 29: Übersicht der Morphologieänderungen in MDCK-F3-Zellen über einen Zeitraum von insgesamt einer Woche nach Behandlung mit entweder 5 mM ASS oder 10 mM LiCl. Vergrößerung der Bilder 1:100.





1 Woche

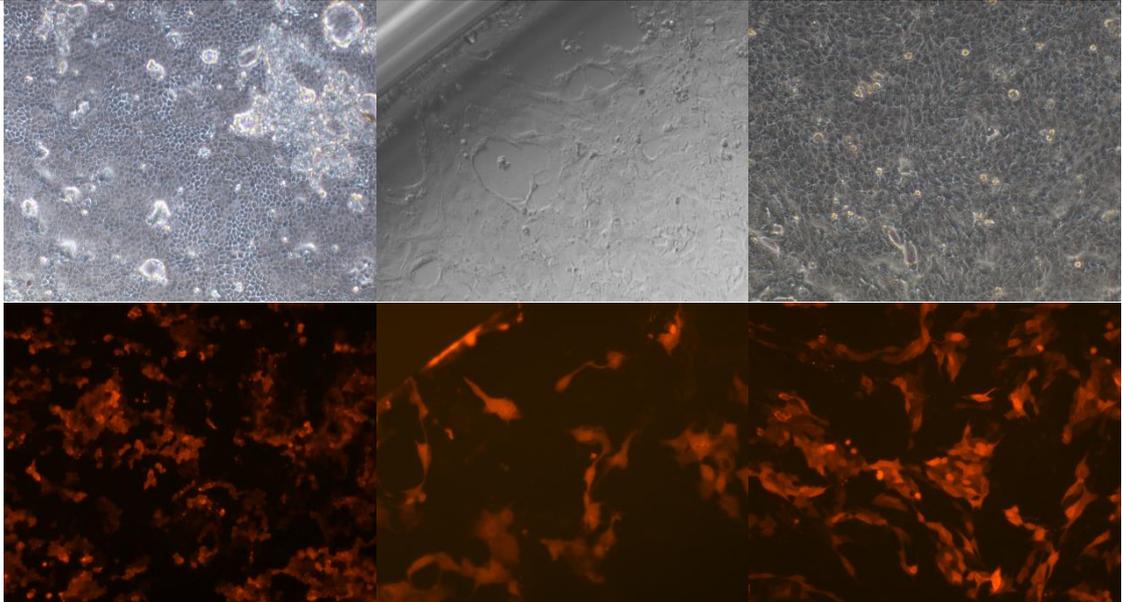


Abbildung 30: Stabile MDCK-cRaf-mCherry-Zellen, die mit entweder ASS oder LiCl behandelt und über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet wurden. Mit ASS behandelte Zellen verloren ihre ursprüngliche Zellgestalt derart, dass sie Ausläufer bildeten und weit auseinander wuchsen. Die Fluoreszenzveränderung zeigte sich nach 4 Stunden am deutlichsten: Kontrollzellen wiesen eine homogene Färbung auf, während sich die Fluoreszenz mit nach LiCl-Behandlung in den Kern zusammen zog und nach ASS-Behandlung in *inclusion bodies* formierte. Vergrößerung 1:100 oder wie angegeben.

## 5. Diskussion

### 5.1. Der Wnt-Signalweg als Ansatzpunkt in Medikamenten-screensings

Im Juni 2013 wurden von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) in Zusammenarbeit mit dem International Council for Standardization of Haematology (ICSH) und der International Clinical Cytometry Society (ICCS) Richtlinien zur Validierung und Beurteilung fluoreszenz-basierter Zellassays in der klinischen Anwendung herausgegeben, um ihren Einsatz zu standardisieren [106]. Dies macht deutlich, welche Bedeutung zellbasierte Assays inzwischen in der Forschung und Entwicklung von neuen potentiellen Arzneistoffen innehaben. Der Vorteil ist vor allem die hohe Signalstärke in Relation zum Hintergrundrauschen bei Vergleich mit herkömmlichen Radioimmunassays [76].

#### *5.1.1. Screeningstrategien im Wnt-Signalweg durch Reportergeneinsatz*

Aufgrund seiner Bedeutung sowohl in der Embryonalentwicklung, Differenzierung und Proliferation von Zellen, als auch in der Krebsentstehung, ist der Wnt Signalweg häufig Ziel der molekularen Krebsforschung und Krebsmedikamentenentwicklung. Die Bandbreite der Testansätze zur Messung der Aktivität des Signalwegs ist groß und reicht von Immunfluoreszenzfärbungen [69] oder Western-Blot-Analysen [107] gegen  $\beta$ -Catenin über Phänotyp-Screenings in *Drosophila* [108], *Xenopus* [109] oder Zebrafisch [110] bis hin zu Reportergenanalysen in Zellen oder ganzen Mausmodellen [111]. Allerdings ist mit den genannten Methoden nur ein indirekter Nachweis der Wnt-Signalwegwirkung möglich. Gerade Phänotyp-Studien erlauben kein Hochdurchsatzscreening nach potentiellen Pharmazeutika und haben daher bestenfalls aufklärenden Charakter. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur nach klar definierten Zielen gesucht wird, beispielsweise Substanzen, die die Lokalisationsänderung des  $\beta$ -Catenins beeinflussen oder die die Induktion einer sekundären Achse in Embryonen verhindern. Daher ist ein Testsystem notwendig, das einerseits spezifisch auf den Wnt-Signalweg reagiert, andererseits mehrere Ziele des Signalweges gleichzeitig erfassbar macht.

Im Jahr 1997 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Korinek das DNA-Bindemotiv, an das der  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF- Transkriptionskomplex bei Aktivierung des Wnt Signalwegs bindet [105]. Kernstück ist dabei der inzwischen etablierte Begriff des TOP-Motivs (*TCF optimal binding site*), bestehend aus der Sequenz 5'-CCTTTGATC-3', bzw. des mutierten FOP-Motivs als Negativkontrolle 5'-CCTTTGGCC-3'. Dieses Bindemotiv ist seitdem Grundlage vieler Reportergenkonstrukte, mit denen Einzelheiten des Signalweges aufgeklärt werden, aber auch für den Einsatz in Medikamentenscreensings. Dabei ergibt sich nur dann ein Signal, sobald der Wnt Signalweg durch eine zugegebene Substanz aktiviert wurde,

oder, entgegengesetzt, durch Inhibitoren wird ein Signal abgeschwächt. Die herkömmliche und am meisten eingesetzte Variante ist die des TOPFLASH-Reporters, in der drei TOP-Motive *upstream* eines Minimalpromotors an eine Luciferase-Aktivität gekoppelt sind. Der Vorteil dabei ist eine hohe Signalstärke bei einem positiven Treffer und eine schnelle Auswertung. Der Nachteil liegt in der zeitaufwändigen Vorbereitung, da oft nur Zellsate eingesetzt werden, im Vorhandensein eines Chemolumineszenz-Detektors und im teuren Materialaufwand. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls auf Grundlage der TOP-Motive Reportergerkonstrukte entwickelt, die statt an eine Luciferase an das grün fluoreszierende Protein eGFP gekoppelt ist. Der Vorteil hierbei liegt in einer direkteren Auswertung der Zielgenexpression am Fluoreszenzmikroskop oder über ein Fluoreszenzphotometer ohne zusätzlichen Materialaufwand. Durch automatisierte Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wäre daher auch eine High-Content-Analyse möglich, die nicht nur Signalstärke, sondern auch die Zellmorphologie und Zellvitalität einbezieht.

In den letzten Jahren haben sich einige Wnt-Testsysteme im HTS-Format etabliert. Ein Beispiel ist ein HCS-Assay für primäre Preosteoblasten, in dem mit Hilfe von Immunfluoreszenz und automatisierter Fluoreszenzmikroskopie nach Wnt-Aktivatoren gesucht wurde [112]. Dabei wurde ein hochsensitivem Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin verwendet, und so mit einem Imaging-Algorithmus nach Lokalisation der Fluoreszenz aufgeschlüsselt, gleichzeitig wurde durch Bewertung der Morphologie Rückschluss auf die Zellvitalität gezogen. Ein Problem in dieser Anwendung stellte allerdings die hohe Zahl der falsch-positiven Ergebnisse dar. Eine Kombination aus ELISA und TOPFLASH-basiertem Live-Cell Imaging stellten Carmon und Loose vor. Mit Hilfe eines GFP-Split-Reporters konnten sie Wnt-Modulatoren auf der Ebene der Fz-Wnt-Rezeptorbindung aufspüren, die anschließend auf ihre Spezifität im Luciferase-Assay getestet wurden [113]. Seit Bekanntwerden des TCF-Bindemotivs und der Weiterentwicklung der entsprechenden Technik sind vermehrt cDNA, RNA oder Microarray-Screenings etabliert worden. Der Nachteil liegt allerdings auch hier häufig in der Notwendigkeit, sich auf einen genau definierten Angriffspunkt, beispielsweise einer Gruppe von Kinasen, zu beschränken [114]. Diese Studien sind allerdings sehr beliebt für die Aufklärung potentieller Zielgene des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs [35].

### *5.1.2. Herstellung neuer Reporterzellen für die Anzeige von Wnt-Signalwegveränderungen*

Der Ansatz, für Medikamentenscreenings stabil transfizierte Zellen einzusetzen, wird häufig genutzt, wengleich der Zeitaufwand in der Vorbereitung durch die Charakterisierung der Klone deutlich höher ist als bei transienter Transfektion direkt während des Assays. Der Vorteil liegt jedoch unbestreitbar im reduzierten Materialaufwand, der Reproduzierbarkeit des Signals durch die damit verbundene Homogenität der Zellen im Assay [36]. Ein solcher Assay wurde von Zhang et al.

etabliert, indem HEK293-Zellen stabil mit einem SuperTOPFLASH-Reporter transfiziert und im *High-Throughput* Screening auf der Suche Wnt-Aktivatoren eingesetzt wurden. Dabei stellte sich das getestete QS11 als Wnt3a-Synergist heraus [115]. Ebenso benutzte Chuang et al. einen bifunktionalen TOPFLASH-Reporter in HEK293 und Jurkat Zellen, um einen Wnt-Inhibitionsassay zu etablieren [67].

Zur Herstellung der Reporterzelllinien für den Einsatz in Screeningassays wurden die in dieser Arbeit erstellten Reporterkonstrukte transient und stabil in verschiedene Zelllinien transfiziert. Nach Überprüfung der Reportergernefunktionalität und der Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden einzelne, stabile Reporterzelllinien hergestellt. Die Transfektionseffizienz unterschied sich je nach verwendeter Zelllinie deutlich; so stellten sich HEK293T Zellen als ausreichend transfizierbar heraus, die anschließende Selektion durch Genitocinsulfat war jedoch aufgrund bereits verwendeter Selektionsmarker nicht möglich. Die Selektion der Zelllinie HEK293T konnte leicht durch mehrmaliges „Picken“ der Klone unter dem Mikroskop bewerkstelligt werden, da diese Zelllinie ein starkes, gut sichtbares Signal aufwies und eine einfache Abgrenzung leicht möglich war. HEK293 Zellen zeigten sich ähnlich transfektionsfreudig, hingegen aber leichter zu selektieren, daher wurden diese für die stabile Transfektion eingesetzt. Der Vorteil der HEK293-Zellen besteht darin, dass diese einen intakten Wnt-Signalwegsapparat besitzen, aber für die normale Proliferation keine Aktivität dieses Signalwegs nötig ist. Ewan et al. machten sich diese Tatsache zunutze, um in ihrem Assayformat zwischen Wnt-Inhibitoren und unspezifischen Wachstumsinhibitoren unterscheiden zu können [116]. Da HEK293 humane Zellen sind, sind sie zudem eher für die Suche nach potentiellen Wnt-Modulatoren für die Krebstherapie geeignet als Zellen anderer Spezies. Park et al. fanden in einem *small-molecule*-Screen mit einem Luciferase-basiertem Assay in HEK293-Zellen Hexachlorophen als Wnt-Inhibitor [117]. HEK293 Zellen werden zudem häufig in Wnt Signalwegstudien eingesetzt, da sie als gut auf den Signalweg reagierend gelten. Sie wurden beispielsweise in cDNA-Array-Screenings eingesetzt, um Wnt-Modulatoren auf genetischer Basis zu finden [118], aber auch für Studien der Bindung von Wnt-Liganden an den Fz-Rezeptor [2].

MDCK-Zellen hingegen zeigten sich unter den Bedingungen als schwer transfizierbar, aber leicht selektierbar. Die Zellen verloren ihr stabiles Signal allerdings fast ausnahmslos wenige Wochen nach Transfektion, sodass sich eine Verwendung dieser Zellen in den Assays als schwierig herausstellte. Der Verlust des Signals wurde bei einem ähnlichen Versuch von Vadolas et al beschrieben, in dem K562-Zellen stabil mit einem eGFP-Reporter transfiziert werden sollten [119]. Die Fluoreszenz war 190 Tage nach Selektion des Klons verschwunden, in PCR-Nachweisen zeigte sich ebenfalls der Verlust des Inserts. Die Autoren vermuteten als Ursache dafür einen unspezifischen Chromosomenverlust. Da sich in den Zellen das Insert mittels PCR nachweisen ließ, wird der

Funktionsverlust durch Mutation vermutet. Eine Sequenzierung des betroffenen Signalbereichs war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund ihrer APC-Mutation sind SW480 Zellen, humane Kolonkarzinomzellen, für Wnt-Inhibitor-screenings geeignet. Sie sind leicht transfizierbar, die Selektion stellte sich unter den Kulturbedingungen allerdings als langwierig heraus: Eine langsame Proliferation verzögerte die Wirkung des Geneticins. Aufgrund ihres konstitutiv aktivierten Wnt-Signalweges zeigten die Zellen nach Transfektion ein starkes Fluoreszenzsignal, sodass die Klone zusätzlich zur Geneticinselektion unter dem Fluoreszenzmikroskop vereinzelt und sortiert wurden. Eine Charakterisierung der Reporterogenreaktivität fand durch Ausbleichen einzelner Klone im Live-Cell Imaging statt (siehe Abschnitt 5.2.2.). Neben HEK293 Zellen sind SW480 Zellen die am meisten eingesetzten Zellen in Screeningassays. Diese umfassen sowohl micro-RNA-screenings [120] als auch TOPFLASH-Reporterstudien [35] [116].

Das Einfügen der Reporter-DNA in das Genom der Zelle erfolgte zufällig, da auf die Verwendung einer Insertionskassette verzichtet wurde. Dies vereinfacht zwar die generelle Transfektion, da das verwendete Plasmid deutlich kleiner ist. Die Selektion der Klone gestaltete sich dadurch jedoch aufwändiger, da durch das ungerichtete Einfügen auch unerwünschte Mutationen im Genom entstehen können, bis hin zur Veränderung des Zelltyps oder sogar dem Zelltod. Eine Alternative zur genutzten Lipofektion stellt die Benutzung viraler Vektoren dar, die häufig für Reporterstudien eingesetzt werden, da die Transfektionseffizienz vielfach höher und die Insertion des Gens spezifischer ist. Zudem kann ein deutlich größerer Transfektionsvektor benutzt werden. Fuerer und Nusse haben beispielsweise einen lentiviralen 7xTCF-EGFP- und einen 7xTCF-FLuc-Reporter etabliert um damit den Wnt-Signalweg in verschiedenen Zelltypen zu untersuchen [121]. Ein fast identischer Ansatz ist die von Horst et al. beschriebene Variante ihres lentiviralen Expressionsvektors. Hier wurde eGFP ebenfalls unter die Kontrolle von sieben TOP-Motiven gestellt [122], zusätzlich wurde konstitutiv exprimiertes mCherry als Transfektionskontrolle genutzt. Ein Ziel dieser Arbeit war die Suche nach einer Beziehung zwischen dem Wnt- und dem Raf/Ras Signalweg. Dazu wurden Methoden der Immunhistochemie und der Durchflusszytometrie eingesetzt. Trotz der Vorteile eines lentiviralen Vektors, ist die Handhabung komplizierter und darf aufgrund der Gentechniksicherheitsverordnung des Gentechnikgesetzes nur in wenigen Laboratorien durchgeführt werden.

#### *5.1.2.1. Promotor-regulierte Reporterzelllinien*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konstrukte pDisplay- $\Delta$ Top-EGFP3a, pDisplay-SuperTopEGFP4-1-5 und pSTeneu4 als TCF-promotorregulierte Reporter entwickelt und stabil in HEK293T, HEK293 beziehungsweise SW480 Zellen transfiziert.

Die resultierenden Zelllinien HEK293- $\Delta$ Top3a F10, HEKT-STE4-1-5 1C und HEK293-STeneu4 A2/A3 wurden unter Verwendung des GSK3 $\beta$ -Inhibitors LiCl auf ihre Reaktivität gegenüber Wnt-Signalwegsaktivierung getestet. In HEK293- $\Delta$ Top3a F10 Zellen, in denen eGFP an drei hintereinander gekoppelte TOP-Motive gekoppelt ist, war diese Reaktivität deutlich, sobald die Zellzahl pro Well einbezogen wurde: bei einer Konzentration von 10 mM eingesetztem LiCl verdoppelte sich die relative Fluoreszenz pro Zelle deutlich gegenüber der nicht-behandelten Kontrolle, während mit 10  $\mu$ M LiCl noch keine Reaktion zu sehen war. Insgesamt war die Signalstärke jedoch gering. Somit können in diesen Zellen Signalwegsstudien nur auf Einzelzell-Ebene durchgeführt werden. Um die sichtbare Reaktivität weiter zu erhöhen, wurden in dem Konstrukt pDisplay-SuperTopEGFP4-1-5 die TOP-Motive zu insgesamt sechs Motiven verdoppelt. Die Wirkung nach Transfektion in HEK293T Zellen war enorm: Das Fluoreszenzsignal in den Zellen zeigte sich annähernd auf dem gleichen Level wie die Positiv-Kontrolle HEKT-EGFPA1, in denen eGFP unter dem konstitutiven CMV-Promotor kontrolliert wird. Bei Aktivierung des Wnt Signalweges mit verschiedenen Konzentrationen an LiCl zeigten diese Zellen auch eine erhöhte Reaktivität, am höchsten bei einer Konzentration von 1 mM LiCl nach 24 Stunden und von 10 mM nach 48 Stunden. Diese Ergebnisse stimmen mit Versuchen anderer Arbeitsgruppen überein, in denen die Reaktivität auf LiCl ebenfalls in dieser Konzentrationsgrößenordnung liegt [123] [124][116], selten höher bei 20 mM [125][67]. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Reportervektors ist die Möglichkeit, Zellen mit aktiviertem Signalweg aus einem Zellpool zu fischen (Kapitel 5.1.3.1).

Rios et al. generierten mehrere TCF-GFP-basierte Reportervektoren auf der Grundlage der Veröffentlichungen der letzten zehn Jahre und wählten für die vergleichende Untersuchung die Entwicklung der Somiten im lebenden Hühnerembryo [126]. Dabei verwendeten sie insgesamt vier verschiedene Konstrukte: drei, acht oder zwölf TCF-Bindestellen gekoppelt an entweder Wildtyp-GFP oder destabilisiertes eGFP mit einer Halbwertszeit von zwei Stunden. Wie auch in dieser Arbeit stellten sie fest, dass sich die Reaktivität gegenüber Wnt-Signalwegsaktivierungen erhöhte, je mehr TCF-Motive verwendet wurden. Außerdem zeigte sich das Signal in Wildtyp-GFP länger nach der Aktivierung, als bei Verwendung des destabilisierten eGFPs, sodass Letzteres eine genauere, zeitaufgelöste Anzeige des Wnt-Aktivitätsstatus repräsentiert. Diese Beobachtung wurde durch Vergleich der mRNA-Transkripte validiert. Die Verwendung von destabilisierten GFP stellt daher eine Korrektur in der Anwendung von fluoreszierenden Reportern dar, in denen der Kernpunkt die zeitaufgelöste Aufklärung im Wnt Signalweg ist. Für fluoreszenzbasierte Assays kann die stabilisierte Form des eGFP verwendet werden: durch die lange Halbwertszeit von bis zu 48 Stunden sind Screenings leichter durchzuführen, da sich das Signal je nach Anwendung positiv potenzieren kann und somit leichter detektieren lässt. Allerdings muss erwähnt werden, dass eine Erhöhung der Sensitivität auch immer mit einer Verringerung der Spezifität einhergeht

Aufgrund der Peptidsignalsequenz PDGFR und der Igκ-chain-Leadersequenz des verwendeten pDisplay-Plasmidrückgrats sind in HEK293-ΔTop3a F10 und HEKT-STE4-1-5 1C Zellen keine Wnt-Inhibitionsversuche möglich; eGFP wird nach Expression an die Außenseite der Zellmembran lokalisiert, was ein enorm stabiles Fluoreszenzsignal zur Folge hat, selbst nach Deaktivierung des Signalweges. Im Reporterengenvektor pSTeneu4 wurde diese Signalsequenz herausgeschnitten. Die stabil transfizierten Klone HEK293-STeneu4 A2/A3 wurden durch Genitocinbehandlung und Picken nach Aktivierung mit LiCl unter dem Fluoreszenzmikroskop selektiert. Hier zeigte sich 48 Stunden nach Zugabe von 10 mM LiCl zunächst eine deutliche Signalsteigerung auf fast das Doppelte in den ersten Experimenten, im Laufe der weiteren Zellkultivierung wurde diese Reaktivität abgemildert auf etwa das 1,5-fache. Insgesamt ist diese Zelllinie damit geeignet für den Einsatz in Aktivierungsassays. Im Gegensatz zu den HEK293-ΔTop3a F10 Zellen zeigen die Zellen insgesamt ein hohes Fluoreszenzsignal, allerdings fast ohne spontane eGFP-Expression in der unbehandelten Kontrolle wie in HEKT-STE4-1-5 1C Zellen.

Die Zelllinie SW480-STeneu4 wurde für den Einsatz in Inhibitionsassays entwickelt. Solche Assays in SW480 Zellen sind häufig TOPFLASHAssays [127][128][8]; durch die kurzlebige Chemolumineszenz wird kein Signal detektiert, sobald die TCF-Bindestelle blockiert wird. Anders in der in dieser Arbeit entwickelten Zelllinie: Durch die deutliche Fluoreszenz der Zelllinie ist eine einfache Detektion möglich, das stabile eGFP erlaubt allerdings keine Versuche auf demselben Prinzip wie der kompetitive Assay in HEK293-STeneu4 Zellen, obwohl der selbe Reporter benutzt wurde, oder bei Einsatz eines TOPFLASH-Reporters. Um dies zu umgehen, generierte Sharma et al. eine Reporterzelllinie basierend auf SW480 Zellen, komplementierte die APC-Mutation aber durch Transfektion von WT-APC oder verkürztem APC. So konnte dennoch ein fluoreszierender, zuverlässiger Expressionsreporter genutzt werden, in diesem Falle, um β-Catenin-vermittelte Lokalisation von APC an die Zellmembran zu untersuchen [20]. Als HTS-Methode ist dieser Ansatz jedoch ungeeignet.

Als Live-Cell Imaging-Ansatz wurde die Idee eines fluoreszierenden Reporters von der Gruppe um Ferrer-Vaquer aufgegriffen, um Embryonen transgener Mäuse zu untersuchen. Als Promotor wurde ein hsp68-Minimalpromoter verwendet und mit insgesamt 6 TOP-Motiven gekoppelt, diese wiederum kontrollierten die Expression eines Histon-GFP-Fusionsproteins. Dadurch wurde hochauflösendes Live-Cell Imaging sowohl in den Embryonen, als auch auf Einzelzell-Ebene möglich [90]. Derselbe Reporter wurde anschließend von Jacques et al. genutzt, um die Bedeutung des Wnt-Signalweges während der Entwicklung der Hörschnecke herauszustellen [123]. Einen fast identischen Ausgangspunkt verwendeten Currier et al. zur Verfolgung des Wnt-Signalweges im Embryo [111], in dem ein 7xTCF/Lef-EGFP Reporter zur Herstellung transgener Mäuse genutzt wurde. In dieser Arbeit

konnte das Reportergenkonstrukt pSTeneu4 in HEK2293 Zellen für Live-Cell Imaging angewendet werden, indem die Konzentrationsgrenzen von LiCl und dessen damit verbundene GFP-Expressionssteigerung untersucht wurde. Dabei ergab sich eine Signalsteigerung frühestens nach 16 Stunden und am höchsten mit 10 mM LiCl.

#### 5.1.2.2. *Nachverfolgung von $\beta$ -Catenin in der Zelle*

Es gibt viele Ansätze, die auf einer Lokalisierung oder Analyse von  $\beta$ -Catenin auf Einzelzell-Ebene beruhen. Aufgrund seiner Translokation in den Zellkern nach Signalwegsaktivierung ist  $\beta$ -Catenin vor allem für Signalwegstudien, aber auch in High-Content-Analysen ein dankbares Ziel. Dabei beruht die Analyse entweder auf Antikörper-basierte Färbungen [112][91][129], Western-Blot-Analyse [130][131] aufgeschlüsselt in einzelne Kompartimente oder, seltener, Kopplung an ein fluoreszierendes Protein für Live-Cell Imaging [8][132]. Letzteres wird oft an eine Bleachingmethode gekoppelt, um Transportgeschwindigkeiten oder –mechanismen des  $\beta$ -Catenins zu untersuchen [101].

Naik und Piwinca-Worms etablierten einen Ansatz, in dem  $\beta$ -Catenin an Luciferase-Aktivität gekoppelt in transgenen Mäusen benutzt wurde [133]. Das außergewöhnliche an diesem Test ist die einfache Nachverfolgung des Signalwegs in einem ganzen Organismus und in Echtzeit, da TCF-Transkriptionsassays zeitverzögert ablaufen. Die selbe Arbeitsgruppe optimierte diesen Ansatz später für das Live-Cell Imaging in einem micro-RNA-Screen, allerdings unter Benutzung des TOPFLASH-Reporters [114]. Eine vielschichtige Studie von Kam und Quaranta benutzte photoaktivierbares, GFP-gekoppeltes  $\beta$ -Catenin als Kernexperiment und evaluierte seine Ergebnisse zur Cadherin-Catenin-Bindung in den *adherence junctions* zusätzlich durch Immunfärbung, TOPFLASH-Reporter und Live-Cell Imaging [22].

#### *Wahl der Zelllinie*

Die Aktivierung  $\beta$ -Catenin-abhängiger Zielgene beginnt mit der Stabilisierung des Proteins im Zytoplasma. Diese Stabilisierung kann künstlich durch die Benutzung eines Vektors hervorgerufen werden, der die Zelle zu einer konstitutiven Expression des  $\beta$ -Catenins veranlasst. Dadurch wird der Wnt-Signalweg ohne endogenen Einfluss aktiviert. Es wurde bewiesen, dass der Transport in den Nukleus einem steady-state entspricht, d.h., je mehr  $\beta$ -Catenin vorhanden ist, umso mehr Transporter werden in und aus dem Nukleus exprimiert, sodass die Konzentration im Nukleus konstant bleibt [101]. Es ist daher anzunehmen, dass dasselbe auch für den *destruction complex* gilt. Dennoch führt eine überproportionale Menge an  $\beta$ -Catenin in der Zelle unweigerlich zur Aktivierung des Signalweges. Diese Feststellung wird in vielen Studien genutzt, um z.B. in HEK293-Zellen nach Transfektion mit einem solchen Reporter den Signalweg künstlich einzuschalten [134]. Soweit bekannt, gibt es keinen Assay basierend auf HEK 293 Zellen, in dem ein  $\beta$ -Catenin-GFP-Fusionsprotein

in der Zelle zum Zwecke eines Inhibitorenscreenings nachverfolgt wird. Solche Fusionsproteine werden bislang nur für reine Signalwegstudien eingesetzt. Somit wurde mit den in dieser Arbeit vorgestellten Reporterkonstrukten pBcatenin-GFP und pBcatenin-mCherry ein neues Tool für die Nachverfolgung des Wnt-Signalwegs in der Zelle etabliert. Da das Fusionsprotein unter dem CMV-Promotor exprimiert wird, ist der Signalweg in der transfizierten Zelle eingeschaltet. Damit kann es zur Suche nach potentiellen Wnt-Inhibitoren eingesetzt werden. Bei der stabilen Transfektion der Zelllinien HEK293, HEK293T und HT29 trat allerdings eine ungewöhnliche Beobachtung auf: statt erhöhter Proliferation und Überlebensfähigkeit, wie nach zahlreichen Studien bei erhöhtem  $\beta$ -Catenin-Spiegel erwartet [135][33][136], starben die Zellen, bevor ein endgültiger, stabiler Klon selektiert wurde. Es blieben nur Zellen ohne sichtbare Fluoreszenz zurück, in einem PCR-Nachweis konnte das Reporterkonstrukt noch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da die gleichen Zellen mit dem Vergleichsvektor pDisplay-EGFP keine Einschränkung der Lebensfähigkeit oder in der eGFP-Expression zeigten, scheint  $\beta$ -Catenin selbst der Auslöser zu sein. Kim et al. machte exakt die gleiche Beobachtung beim Versuch, NIH3T3 Zellen mit einem  $\beta$ -Catenin-GFP-Reporter stabil zu transfizieren: Bereits acht Tage nach Transfektionsbeginn waren nur noch Zellen ohne Fluoreszenz vorhanden [73]. In derselben Studie wurde darauf aufmerksam gemacht, dass allein  $\beta$ -Catenin, nicht aber zusätzliches LEF-1 für die Apoptose verantwortlich ist; der Zelltod scheint daher nicht abhängig von den  $\beta$ -Catenin-induzierten Zielgenen zu sein. Durch die Transfektion formierte sich  $\beta$ -Catenin im Zellkern zu Aggregaten, was Kim als Grund für die Apoptose sah [137]; es ist bislang noch nicht bekannt, ob dieser Effekt direkt durch  $\beta$ -Catenin induziert wurde oder sekundär ist. Vermutlich wird die Apoptose über eine p53-Aktivierung induziert [138]. Sowohl Daten von Kim et al als auch aus der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass normale Zellen über einen längeren Zeitraum nicht in der Lage sind, mit einem erhöhten, endogenen  $\beta$ -Catenin-Spiegel umzugehen. Das zelleigene Apoptoseprogramm greift bei Überexpression eines Kontrollproteins, um fehlerhafte Zellen aus dem Körper zu entfernen [73]. In Krebszellen ist dieser Kontrollmechanismus außer Kraft gesetzt, weshalb diese einen erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel nach Mutation zulassen. Aber selbst Tumorzellen mit einem erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel überleben nur, wenn ebenfalls Bcl überexprimiert wird [73][139]. Laut Giannini & Vivanco ist die stabile Transfektion eines  $\beta$ -Catenin-Reporters auch in SW480 Zellen nicht möglich [140].

#### *$\beta$ -Catenin in MDCK- $\beta$ cat-mcherry Zellen*

Nur wenige Nicht-Krebs-Zelllinien überleben die Überexpression von  $\beta$ -Catenin durch stabile Transfektion dauerhaft, ohne in die Apoptose zu gehen. Eine davon ist die Epithelzelllinie MDCK [141], weshalb diese für die stabile Transfektion des Reporters pBcatenin-mCherry genutzt wurde. Liu et al. charakterisierten verschiedenen Zelllinien für den Einsatz eines  $\beta$ -Catenin-Reporters und

stellten fest, dass MDCK Zellen bereits hohe Level an  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin exprimieren, was vermutlich der Grund für die starken Zell-Zell-Kontakte und das dichte, plättchenartige Wachstum in Kultur ist [142]. Auch in MDCK Zellen zeigte sich ein unsteter Transfektionserfolg: MDCK- $\beta$ cat-mCherry zeigten eine heterogene, mosaikartige Expression des Fluoreszenzproteins, während das Signal in  $\beta$ Catenin mCherry-exprimierenden Zellen homogen innerhalb der Zelle verteilt war. Es konnte eine leichte Konzentration des Signals an der Zellmembran erkannt werden, obgleich durch das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Catenin eine erhöhte Konzentration im Zellkern zu erwarten gewesen wäre. Bei höherer Passagezahl verlor sich auch hier das Fluoreszenzsignal, weshalb auch in diesen Zellen keine Nachverfolgung des  $\beta$ -Catenin möglich war. Diese Zelllinie wurde jedoch bei der Untersuchung von Morphologieänderungen erfolgreich eingesetzt (siehe Kapitel 5.3).

Schlussendlich gelang die Transfektion einer Mutante in HEKB Zellen, die sich ausreichend stabil für eine Studie zeigte.

#### *$\beta$ -Catenin in HEKB- $\beta$ cat-mcherry Zellen*

HEKB ist eine von Paul Polakis (Genentech, USA) hergestellte HEK293-Variante, welche bereits mit einer mutierten Form des  $\beta$ -Catenins stabil transfiziert wurde und somit bereits eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs zeigt [143]. Die oben ausgeführte Beobachtung, dass Zellen mit erhöhtem  $\beta$ -Catenin-Spiegel in die Apoptose gehen, konnte in HEK- $\beta$ cat-mCherry-Zellen nachvollzogen werden. Die Zellen, die ein besonders hohes Fluoreszenzsignal zeigten, lösten sich von der Oberfläche der Kulturschale ab, zeigten kugelförmige Morphologie und starben. Es konnten dabei keine Unterschiede in der Lokalisation des Fusionsproteins zwischen Zellkern und Zytoplasma ausgemacht werden – die Fluoreszenz zeigte sich einheitlich stark. Sobald sie allerdings mit Aspirin versetzt wurden, zeigte sich innerhalb 24 Stunden eine konzentrationsabhängige Verschiebung des Signals hin zur Zellmembran und in das Zytoplasma. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass  $\beta$ -Catenin sowohl dem zytoplasmatischen Pool als auch im Komplex mit E-Cadherin zugeführt werden kann, sobald sich Aktivitätsänderungen des Wnt-Signalwegs einstellen [22][144][145]. Anders herum zeigte sich bei zusätzlicher Aktivierung der Zellen mit LiCl eine kurzzeitige Konzentrierung des Signals im Zellkern, allerdings auch eine erhöhte Apoptose der Zellen. Dies ist damit zu begründen, dass die Zellen bereits einen aktivierten Signalweg tragen und eine Zugabe von LiCl damit eine zusätzliche Hyperaktivierung mit den oben genannten Folgen bewirkt. Insgesamt ist die Zelllinie HEKB- $\beta$ cat-mCherry geeignet, potentielle  $\beta$ -Catenin-Inhibitoren zu visualisieren. Aufgrund des nicht abgegrenzten Signals ist eine automatisierte Analyse zum Beispiel über High-Content-Screening, in diesen Zellen und in den verwendeten MDCK-Zellen nicht möglich. Eine Verwendung des Reportergenvektors in einer transienten Anwendung für die Verifizierung eines Inhibitors wäre allerdings denkbar. Eine weitere Optimierung des Konstrukts durch Verwendung

eines TOP-Motivs als Promotor wurde vorgenommen, da selbst im nativen Promotor des CTNNB1 Gens TCF-Bindemotive gefunden wurden. Dies resultierte allerdings in einem deutlich verminderten Signal (Daten nicht gezeigt).

#### *$\beta$ -Catenin in HEK293- $\beta$ cat-EGFP Zellen*

Eine stabile Transfektion des Vektors p $\beta$ catenin-EGFP scheiterte aus denselben, oben genannten Gründen. Daher wurde das Konstrukt ausschließlich transient in HEK293 Zellen verwendet. Der Vorteil in der Nutzung eines grünen Fluoreszenzproteins besteht in der besseren Sichtbarkeit unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgrund des geringeren Hintergrundsignals.

In den transient transfizierten Zellen zeigte sich 24 Stunden nach Transfektion bereits ohne Behandlung eine Konzentrierung des Fluoreszenzsignals auf den Zellkern und die Zellmembran. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass  $\beta$ -Catenin bei konstitutiver Expression den Wnt Signalweg aktiviert und somit als Transkriptionsfaktor im Zellkern agiert; zusätzlich gibt es noch einen  $\beta$ -Catenin-Pool an der Membran im Komplex mit E-Cadherin. Bei Zugabe aller vier Inhibitoren Aspirin, FH535, PKF118-310 und XAV939 zeigte sich bereits nach kurzer Zeit eine Lokalisationsänderung des Signals hin zum Zytoplasma, wobei Aspirin die stärkste Veränderung zeigte: die Zellen zeigten teilweise überhaupt keine Fluoreszenz im Zellkern, sondern fast ausschließlich an der Zellmembran. Insgesamt zeigte sich der größte inhibitorische Effekt innerhalb einer Stunde und ging innerhalb von 24 Stunden komplett zurück. Dies zeigt, dass die Verwendung eines  $\beta$ -Catenin-gestützten Reporters eine direktere Wirkung anzeigt als Expressionsreporter wie TOPFLASH oder auch TOP-EGFP.

#### *5.1.3. Kompetitiver Assay als Screeningmethode im Wnt-Signalweg*

Der Grundgedanke des kompetitiven Assays besteht darin, dass mit LiCl aktivierte Zellen eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz gegenüber der nicht-aktivierten Kontrolle zeigen. Gleichzeitiges Aktivieren und Inhibieren mit bekannten Inhibitoren führt demnach dazu, dass nur solche Zellen eine gesteigerte Fluoreszenz zeigen, in denen der potentielle Kandidat eine schwächere Inhibierungsleistung zeigt als durch Aktivierung mit LiCl erreicht, oder der Inhibitor in der Signalkaskade vor GSK3 $\beta$  wirkt und somit nicht kompetitiv wirkt. Die stabile Zelllinie mit den Klonen HEK293-STeneu4 A2/A3 wurde als am besten Wnt-reaktiv getestet (s. Kapitel 5.1.2.1) und ist somit für den Einsatz in Aktivierungsassays geeignet. Die Zellen wurden in ersten Proof-of-Principle-Versuchen gleichzeitig mit LiCl und den bekannten Wnt-Inhibitoren Acetylsalicylsäure [65][146][147], FH535 [66], PKF118-310 [148] und XAV939 [58] behandelt, die an verschiedenen Stellen im Wnt Signalweg angreifen (siehe Kapitel 1.2.3). Als Ergebnis zeigte sich in HEK293-STeneu4 A2 Zellen eine höhere Fluoreszenz nach Applikation von Inhibitoren und LiCl als ohne LiCl (siehe Kapitel 4.3.2). Dies lässt darauf schließen, dass die genutzte Konzentration der Inhibitoren nicht in der Lage ist, die

Aktivierung durch LiCl vollständig zu kompensieren. Interessant ist das Verhalten von Aspirin: In der hohen Konzentration von 5 mM ist es in der Lage, das Signal komplett zu inhibieren, während sich bei einer geringeren Konzentration (0,1 mM) offensichtlich keine entgegengesetzte Wirkung zu LiCl zeigt. Diese Beobachtung ist kongruent mit einer Studie zur Wirkungsweise von Aspirin [8], wonach seine Wirkung dosisabhängig ist und es erst in höheren Konzentrationen (bis hin zu 10 mM) seine vielfach nachgewiesene Wnt-Inhibition zeigt [149], [150]. In allen Versuchen zeigte sich FH535 als kompetenter Inhibitor, allerdings mit stark zytotoxischen Eigenschaften in dieser Zelllinie. Insgesamt erwiesen sich die Ergebnisse nach 24 Stunden reproduzierbarer als nach 48 Stunden; es ist anzunehmen, dass die aktivierende Wirkung von LiCl die der Inhibitoren nach 48 Stunden überdauerte. In HEK293-STeneu4 A3 Zellen wurde tendenziell eine höhere Signalintensität nach Zugabe von LiCl und Inhibitoren als in Zellen nur mit Inhibitor festgestellt. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Positiv-Kontrolle und der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Auf der Suche nach Wnt-Inhibitoren werden häufig stabil oder auch transient transfizierte Reporterzellen im Assay erst aktiviert, um anschließend potentielle Inhibitoren zu finden, die diese Aktivierung komplementieren. Üblicherweise wird dafür entweder gereinigtes Wnt3a-Protein hinzugegeben [151][152][153] oder Wnt3a-konditioniertes Medium genutzt [112][11][130][154]. Der Nachteil in Letzterem besteht darin, dass den Zellen nicht nur Wnt3a-enthaltendes Medium zugegeben wird, sondern dieses auch noch Wachstumsfaktoren und andere Proteine beinhalten, die von den Wnt3a-produzierenden Zellen abgesondert werden. Somit ist diese Methode als überprüfendes Werkzeug geeignet, aber nicht für die Anwendung in einem reproduzierbarem, spezifischem Assay, obgleich es auch hier gegenteilige Studien gibt [112]. In eigenen Versuchen wurde festgestellt, dass LiCl eine direktere, schnellere Antwort auf Aktivierung des Wnt-Signalweges hervorruft als Wnt3a, weshalb es für diesen kompetitiven Assay genutzt wurde. Bei der Charakterisierung verschiedener Zelllinien hinsichtlich ihrer Wnt-Reaktivität von Sievers et al. wurde eine gegensätzliche Beobachtung gemacht: Hier war die Reaktivität durch Aktivierung des Wnt Signalwegs in HEK293 Zellen höher nach Aktivierung mit Wnt3a als nach LiCl-Zugabe [155]. Allerdings wurden in dieser Studie ausschließlich die intrazelluläre Konzentration an  $\beta$ -Catenin gemessen und nicht die Expressionsstärke nach Transkriptionsstart, außerdem wurde Wnt3a-konditioniertes Medium verwendet, sodass eine zusätzliche Wirkungsverstärkung nicht ausgeschlossen werden kann. Silva et al. entschieden sich ebenfalls für LiCl anstatt für Wnt3a, da LiCl in den getesteten Retinablastomen einen „größeren phänotypischen Effekt erzeugten als Wnt3a“ [156]. Für Kam und Quaranta war LiCl in ihrer Studie besser als Wnt3a geeignet, um die Interaktion von  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin im Wnt-Signalweg zu studieren, da „es einfach die Degradation von  $\beta$ -Catenin [...] verhindert, ohne dabei die zusätzlichen Auswirkungen zu zeigen, die Wnt3a haben würde“ [22].

LiCl ist ein bekannter und potenter Inhibitor der Kinase GSK3 $\beta$  [30], [131], [157] und wird häufig für die Aktivierung des Wnt-Signalweges eingesetzt. Obwohl GSK3 $\beta$  an der Schnittstelle mehrerer Signalwege steht und somit ein unspezifischer Wnt-Modulator ist [57], ist LiCl dennoch für die Aktivierung des Wnt Signalweges geeignet. Ewan et al. benutzten sowohl  $\beta$ -Estradiol als auch die GSK3 $\beta$ -Inhibitoren LiCl und 6-Bromoindirubin-3'-Oxim in einem ähnlichen Assayformat wie dem Vorgestellten auf Basis eines TOPFLASH-Zellassays auf der Suche nach Wnt-Inhibitoren [116][154]. In einem Screening nutzten Anton et al. die Aktivierung durch LiCl, um microRNAs zu finden, die diesen Effekt kompensieren [120]. Weiterhin wird LiCl in zahlreichen Studien eingesetzt, um den Wnt Signalweg selbst zu untersuchen; so fanden Kang und Min durch Einsatz von LiCl eine Feedback-Schleife nach Aktivierung  $\beta$ -Catenin-abhängiger Transkription [158], ebenso Ziegler et al. auf ihrer Suche nach Wnt-Zielgenen [35]. Deng et al. verwendeten für die Aufklärung des Wirkmechanismus von Aspirin ebenfalls LiCl als Wnt-Aktivator [159].

Bisher ist in der Literatur kein kompetitives Testsystem genannt, in dem ein fluoreszenzbasierter Zellassay für das Screening nach Wnt-Inhibitoren eingesetzt wird. Wie oben ausgeführt, gibt es einige Ansätze, die eine Transfektion von Luciferase-Reportern nutzen, nicht jedoch fluoreszenzbasiert sind. Sowohl die vorgestellten Zellen HE293-STeneu4 A2 als auch der verwendete Vektor schließen diese Lücke. In der dargestellten Anwendung ist somit die Suche nach Wnt-Modulatoren, sowohl positive als auch negative, in kleinem Maßstab möglich.

#### 5.1.3.1. *Sortieren von Wnt-positiven Zellen*

Die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Oberflächenproteine mit Hilfe von Antikörpern zu fangen wurde bereits 1970 für Lymphozyten beschrieben [160] und 1976 als FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) weiter entwickelt [161]. Ursprünglich durch Markieren von Oberflächenmarkern mit fluoreszierenden Antikörpern angewendet, wurde die Methode zehn Jahre später um die Transfektion fluoreszierender Reporterproteine erweitert [162]. Diese Methode wurde seither verfeinert und automatisiert und ist heutzutage eine Standardmethode vor allem in klinischen Einrichtungen. Die dazu Notwendigen sind auch heute noch teuer und daher nicht in jedem Labor zu finden. Die klassischen, einfachen Methoden der Trennung verschiedener Zelltypen basieren auf unterschiedlichen physiologischen Unterschieden, wie Größe und Zelldichte (Trennung durch z.B. Gradienten- oder Ultrazentrifugation, Filtration) oder Oberflächenspannung (Trennung über z.B. Elektrophorese, Chromatografie) [163]. Gerade im diagnostischen Bereich stellt das Fangen weniger, morphologisch *gleicher* Zielzellen aus Körperflüssigkeiten eine herausfordernde, allerdings unumgängliche Notwendigkeit dar: Beispiele sind die Analyse von Immunzellen aus Blut oder von Stammzellen im Knochenmark oder das Abfangen von im Blut zirkulierenden Tumorzellen (engl.: *Circulating Tumor Cells*, CTCs). Gerade auf Letztere wurde in den letzten zehn Jahren vermehrt das

Augenmerk gerichtet. Im Blut zirkulierende Tumorzellen, die sich vom Primärkarzinom abgelöst und in die Blutbahn oder Lymphflüssigkeiten gelangt sind, sind das erste Anzeichen eines metastasierenden Tumors. Sie zeichnen sich durch ihre dedifferenzierte Physiologie aus. Hinter dem Vorgang, wie die Zellen zu CTCs werden, wird eine komplexe Programmierung vermutet, die seit einigen Jahren zu entschlüsseln versucht wird, zumal in soliden Tumoren selbst CTC-Vorläufer entdeckt wurden [37].

Die spezifische Isolation von CTCs könnte die Biopsie von Tumoren als Diagnostik-Methode ersetzen und somit die Krebsfrüherkennung vereinfachen [164]. Methoden, um das Abfangen oder Konzentrieren dieser CTCs vor allem aus Blut zu optimieren, wurden in den letzten Jahren daher vermehrt entwickelt. Bei den meisten handelt es sich dabei um antikörperassoziierte Methoden, in denen spezifische Antikörper auf Membranen[165], Platten, [166] Poren [167] oder anderen, festen Oberflächen [168] immobilisiert werden und als Zellaffinitäts-Chromatografie bezeichnet wird (engl. *Cell affinity chromatography*, CAC) [169][170]. Solche Antikörper sind fast ausschließlich gegen EpCAM gerichtet, ein Rezeptorprotein, was vermehrt auf der Oberfläche von Krebszellen zu finden ist [164]. Diese Antikörper können direkt an eine Oberfläche gebunden, oder mit magnetischen Beads oder Fluoreszenzmarkierungen assoziiert sein [163][171]. Ebenso wurden Mikrochip-Varianten entwickelt [172]. Inzwischen wurden auch Mikrofluidik-Anwendungen etabliert, die bereits entwickelte Ansätze kombinieren, und in denen die Zellen über mehreren Stationen mit verschiedenen Antikörper geleitet und somit sortiert und konzentriert werden können [173]. Microarray-Formate für die simple Analyse gleich multipler Oberflächenmarker aus dem Blut, nicht nur für CTCs, wurden seit 2005 vermehrt beschrieben und erweitert [174][175][176][177]. Varianten ohne Antikörper beinhalten auch die Aufreinigung über Ionenkanäle [178]. In einem völlig neuen Ansatz werden die Zellen über ionisierte Glasoberflächen gefangen, was den Vorteil hat, auch Zellen ohne EpCam-Expression zu filtern [179]. Allen genannten Methoden ist gemein, dass die Zellen nach dem Sortiervorgang noch lebensfähig sind und aus den eingefangenen Zellen Monokulturen angelegt werden können [163].

Der in dieser Arbeit entwickelte Vektor pDisplay-STE4-1-5 vereint die hohe Effizienz durch antikörperassoziiertes Sortieren mit der einfachen Analyse über Fluoreszenz. Durch Transfektion dieses Vektors in Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg wird das exprimierte eGFP direkt an die Außenseite der Zellmembran verankert. Das wurde ausgenutzt um eine Methode zu entwickeln, mit welcher Wnt-positive Zellen von inaktiven Zellen getrennt werden können, unabhängig von ihren bereits auf der Oberfläche exprimierten Markern. Das dafür gewählte System, *Magnetic Adsorption Cell Separation* mit MicroBeads, bereitgestellt von der Firma Miltenyi Biotec, wird bereits seit Jahren kommerziell in der Diagnostik eingesetzt, um Immunzellen aus Körperflüssigkeiten zu isolieren und analysieren.

Üblicherweise wird diese Methode gekoppelt an eine durchflusszytometrische Analyse, beispielsweise FACS-Analyse [180]. In dieser Arbeit wurde die Auswertung fluoreszenzmikroskopisch vorgenommen. Die stabile Zelllinie HEKT-STE4-1-5 1C wurde 24 Stunden vor dem Sortieren mit LiCl behandelt, um den Wnt Signalweg zu aktivieren. Während der Zellseparation wurde jede Fraktion gesammelt, manuell gezählt und weiter kultiviert, um sie anschließend zu untersuchen. Die neue Methode wurde erfolgreich etabliert: die positiv sortierten Zellen zeigten zu 100 % eine Fluoreszenzfärbung der Membran. Zellen, welche als negativ sortiert wurden, zeigten zuweilen dennoch eine schwache Fluoreszenz. Dies kann der Verwendung des Säulensystems geschuldet sein und möglicherweise durch Verwendung größerer Säulen behoben werden, um die Ausbeute noch weiter zu erhöhen.

Eine ähnliche Methode wurde von den Entwicklern des pDisplay-Vektors, der Grundlage des hier beschriebenen Reportergenvektors ist, beschrieben. Chesnut et al. ließen auf der Außenseite der Membran von transient transfizierten Zellen einen Antikörper exprimieren, der wiederum von einem Antigen oder einem Zweit-Antikörper im ELISA-Format erkannt werden konnte [181].

## 5.2. Bleaching als Screeningmethode im Wnt Signalweg

### 5.2.1. Untersuchungen des Wnt-Signalweges durch Bleaching

Die exakte Aufklärung von Signalwegen wie dem Wnt Signalweg wurde seit der Optimierung von fluoreszenzmikroskopischen Methoden in den letzten Jahren sehr vereinfacht. Gerade der Einsatz von Bleachingmethoden erlaubte einen genaueren, hochaufgelösten Blick auf die Prozesse innerhalb einer Zelle nach Aktivierung des Wnt Signalwegs. Krieghoff et al. nutzten die FRAP-Methode, um Kinetikanalysen von  $\beta$ -Catenin während seinem Nukleus-Zytosol-Übergang zu machen. Dafür wurden mYFP-baserte Reporter in HEK293 Zellen verwendet und ein ganzes Kompartiment ausgebleicht. Die Messung der Dauer des Wiederauftauchens der Fluoreszenz (Recovery) gab Aufschluss über die Shuttlegeschwindigkeit [101]. Jamieson et al. erweiterten diese Untersuchungen, und zeigten die Rolle von LiCl im nukleären  $\beta$ -Catenin-Transport [30][182] und welche Sequenzen im  $\beta$ -Catenin die Lokalisation an Zellmembran, Zytosol und Nukleus steuern [19]. Mit derselben Methode zeigten Kim und Davidson, dass der Wnt-Signalweg punktuell die Actinkontraktion in *Xenopus*-Embryonen reguliert [183].

Die in dieser Arbeit etablierte Methode verwendet ebenfalls ein Fluoreszenzausbleichverfahren, allerdings nicht für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen, sondern als neuen Screeningansatz für die Suche nach Wnt-Inhibitoren. Dabei wird nicht nur ein bestimmtes

Kompartiment, sondern ein ganzer Zellverband gebleicht. Durch Messen der Recovery soll Aufschluss über die Wirkung des Inhibitors gegeben werden.

### *5.2.2. Zeitaufgelöstes Bleaching*

Zur Evaluierung des neuen Bleachingansatzes wurden HEKT-STE4-1-5 1C und SW480-STENEu4 zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Fläche von ca.  $1,4 \times 1,4$  mm lokal ausgebleicht. Dabei wurde festgestellt, dass die Verwendung einer LED von 470 nm effizienter als die entsprechende Belichtung durch eine Quecksilberdampflampe war. Ebenso war die Bleichleistung unter Verwendung des Nahfeldobjektivs deutlich höher als bei gleicher Vergrößerung im Weitfeld. Die Lichtleistung war hier jedoch so hoch, dass sie schädigend auf HEKT-STE4-1-5 1C Zellen wirkte. Daher wurden alle weiteren Versuche im Weitfeld durchgeführt. Die Zellen wurde insgesamt eine Stunde belichtet, um ein Ausbleichen auf unter 50 % gegenüber dem Ausgangssignal zu erreichen. Anschließend wurde eine Hintergrundbereinigung vorgenommen, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Recoverykurven zu erzielen: laut Coffman und Wu schwankt die Fluoreszenzintensität um bis zu 27 %, wenn Bleaching für das Zählen einzelner Fluorophormoleküle eingesetzt wird [89].

Für alle erhaltenen Ausbleichkurven wurde eine ähnliche Kinetik errechnet. Die Fluoreszenzrecovery wurde vereinfacht als Gerade errechnet, obwohl hier eher eine Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten gewesen wäre, welche nur in wenigen Durchläufen zu erkennen war. Vermutlich ist dies durch die kurze Überwachungsdauer von maximal 24 Stunden zu erklären. Die Vereinfachung des Verlaufs zur Geraden vereinfacht die Auswertung: Die Wirksamkeit eines Inhibitors kann durch den Vergleich des Geradenanstiegs mit der Kontrolle erkannt werden. Der Erfolg der Methode konnte mit den Inhibitoren FH535 und PKF118-310 in SW480-STENEu4 Zellen nachgewiesen werden: Der Anstieg der Inhibitorgeraden war konzentrationsabhängig niedriger als der der Kontrolle. Die Wirksamkeit des Tankyrase-Inhibitors XAV939 konnte häufig nicht nachgewiesen werden: Der Anstieg und das Fluoreszenzlevel lag oberhalb der Kontrolle. Grund könnte hier die stark gelbe Eigenfärbung der Verbindung sein. In niedriger Konzentration, in der die Verbindung farblos erscheint, konnte keine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden, obwohl diese bereits mehrfach beschrieben wurde [58]. Da hier SW480-Zellen verwendet wurden, kann möglicherweise auch die APC-Mutation nicht durch XAV939 „wegtitriert“ werden, da der Tankyraseinhibitor upstream des APC-Proteins durch Stabilisierung des Axins wirkt [184].

Über eine mögliche Geschwindigkeit der Fluoreszenzrecovery kann keine Aussage getroffen werden, der Beobachtungszeitraum über 12 bzw. 24 h wurde aufgrund von Vorversuchen in anderen Zellen festgelegt. Dabei zeigte sich eine deutliche Verstärkung des Fluoreszenzsignals frühestens 8 h nach Aktivierung mit LiCl in HEK293-STENEu4 Zellen. Jamieson et al. berichteten in ihren FRAP-Versuchen

eine Recovery auf 80% des ursprünglichen Werts innerhalb von 150 Sekunden nach Bleaching, allerdings sind diese Zahlen nicht vergleichbar: Jamieson untersuchten Transportgeschwindigkeiten, keine Expressionskinetiken. Der prinzipielle Verlauf ihrer Recoverykurven deckt sich allerdings mit den in dieser Arbeit erhaltenen Geraden [30].

### *5.2.3. Endpunktbestimmung mittels Bestrahlungskammer*

Der Nachteil der oben beschriebenen Methode liegt in der seriellen Bearbeitung einzelner Proben und dem niedrigeren Durchsatz, da kleine Kulturschalen verwendet werden müssen. Außerdem betrifft die ausgebleichte Stelle nur einen kleinen Punkt innerhalb der Kulturschale. Um dies zu umgehen, wurde ein Aufbau entwickelt, mit dem eine kleine, viergeteilte Kulturschale direkt im Brutschrank bestrahlt und anschließend unter dem Mikroskop untersucht werden kann. Die besten Resultate wurden bei Verwendung von 405 nm LEDs (Spezifikationen in Kapitel 6.3.1) nach drei Stunden Belichtung und weiteren 24 Stunden Erholungsphase erreicht.

Um den Durchsatz dieser Methode zu erhöhen, wurde ein Bestrahlungskasten verwendet, der speziell für eine gleichförmige Ausleuchtung im ganzen Kasten entworfen wurde und freundlicherweise von Dr. Hans-Jochen Foth und Carole Simon (Technische Universität Kaiserslautern) für die Experimente zur Verfügung gestellt wurde (Technische Daten der Kammer im Anhang Kapitel 6.3.2). Durch die hohe Lichtleistung, die dieser Aufbau ermöglicht, konnte die Bestrahlungsdauer auf 10 min reduziert werden. Mit diesem Aufbau konnten verschiedene Klone von SW480-STeneu4 Zellen in mehreren Wells von 24-Well-Platten gleichzeitig bestrahlt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Die Methode des Ausbleichens ganzer Zellen für einen Screeningassay konnte somit erfolgreich im Proof-of-Principle-Format gezeigt und evaluiert werden. Soweit bekannt, gibt es bisher keine Anwendung, die einen ähnlichen Ansatz für die Anwendung im Hochdurchsatzscreening benutzt. Fluoreszenzbleaching-Methoden wie FRAP, FLIP oder Film eignen sich fast ausschließlich nur für die Beantwortung einzelner Fragestellungen in der Einzelzell-Analyse. Dabei liegt der Vorteil eines High-Throughput-Bleachings offensichtlich in der einfachen Handhabung und Auswertung. Ebenso sind die Kosten eines solchen Aufbaus nicht mit den Preisen hochtechnisierter Analgen zu vergleichen. Eine Übertragung auch in andere, promotorregulierten Signalwegen ist realisierbar.

## 5.3. Morphologieveränderungen durch den Wnt Signalweg

Nach Transfektion von MDCK-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pBcatenin-mcherry wurden Versuche zur Aktivierung des Wnt Signalwegs vorgenommen. Durch Zugabe von LiCl und Aspirin sollte eine Veränderung der Fluoreszenzlokalisierung in der Zelle verfolgt werden. Aufgrund der

geringen Transfektionseffizienz in MDCK-Zellen (siehe Kapitel 0) konnte dieses Ziel in diesen Zellen nicht erreicht werden. Stattdessen wurde beobachtet, dass sich die Morphologie der Zellen nach längerer Exposition dieser beiden Substanzen veränderte und diese Veränderung reversibel nach Entnahme war. Dies legte die Vermutung nahe, dass der Wnt Signalweg an dieser Veränderung beteiligt sein könnte, sodass die Untersuchungen auf verschiedene MDCK-Varianten ausgeweitet wurden. Der Effekt war nach Behandlung von LiCl bereits nach 24 Stunden deutlich, nach Behandlung mit ASS nur kurzzeitig und gering.

Die Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Zellmorphologie ist seit langem bekannt: durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin und dadurch bedingt die Bindung an Actinfilamente [185] lässt auf eine tragende Rolle des  $\beta$ -Catenins an der Morphologie schließen. Da der membrangebundene Pool an  $\beta$ -Catenin bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den zytoplasmatischen Teil geführt werden kann und andersherum [186], ist indirekt also der Wnt-Signalweg an der Morphologieänderung beteiligt. Tatsächlich wurde mehrfach bewiesen, dass der Wnt Signalweg einen großen Beitrag zum epithelial-mesenchymalen Übergang während der Embryonalentwicklung leistet (*epithelial-mesenchymal transitions*, EMT). Der Begriff EMT steht für den Verlust des epithelialen Charakters einer Zelle und die Veränderung hin zu einem mesenchymalen Aussehen, vor allem während der Embryogenese und dem Wundheilungsprozess [187]. EMT tritt auch bei der Tumorentstehung beziehungsweise Metastasierung auf. Heuberger und Birchmeier machten die Beobachtung, dass MDCK-Zellen sich aufgrund der EMT fibroblastähnlich entwickeln, sobald E-Cadherin nicht mehr durch  $\beta$ -Catenin gebunden werden kann [186]. Dieser Effekt kann durch Bereitstellung zusätzlichen E-Cadherins rückgängig gemacht werden [188]. Ebenso verändert aber auch die Überexpression von  $\beta$ -Catenin die Zellmorphologie in MDCK aufgrund einer starken Bildung von Zell-Zell-Kontakten [189]. Beide Studien erklären die Ergebnisse, woraufhin MDCK-Zellen nach Behandlung mit LiCl ihre Morphologie zu einem mesenchymalen Phänotyp ändern. C57MG-Zellen wachsen ebenfalls in einer länglichen Gestalt, sobald sie Wnt-1 überexprimieren, was mit einer gleichzeitigen Stabilisierung des zytosolischen  $\beta$ -Catenins einhergeht [190]. Eine weitere Studie zeigte die Veränderung der Morphologie, hier von Nagetier-Fibroblasten, nach Aktivierung mit Wnt3a. Die Autoren führten diese Veränderung auf das Vorhandensein und die Interaktion mehrerer Cadherine zurück [191]. Elbert und Cohen hingegen machten den Wnt-Transducer Dvl für die Morphologieveränderungen in MDCK-Zellen verantwortlich [192]. In HLE B-3-Zellen führt Wnt3a-Zugabe zu einer Verminderung des E-Cadherinlevels, was der Auslöser der EMT ist [185].

Aufgrund der Veränderung der Zellgestalt zu einer Ähnlichkeit von MDCK-F3-Zellen wurde diese Zelllinie ebenfalls in die Untersuchungen integriert. MDCK-F3 ist eine Zelllinie mit einer v-H-Ras-Mutation, welche einen dauerhaft aktivierten Ras/Raf-Signalweg zur Folge hat. Diese Zellen wurden

ursprünglich als Phänotypassay für Raf-Inhibitoren entwickelt [193], [194], da diese Zellen länglich und spindelförmig anstatt gedrängt und regelmäßig wachsen. Dies ließ außerdem auf eine Beteiligung des Raf/Ras-Signalweges schließen, weshalb zusätzlich die stabil transfizierte Zelllinie MDCK-cRaf-mcherry beobachtet wurde. In dieser von Patricia Reischmann (FH Kaiserslautern) zur Verfügung gestellten Zelllinie wurde das Fusionsprotein cRaf-mCherry unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors stabil in MDCK-Zellen integriert. Dies hat eine dauerhafte Aktivierung des Raf/Ras-Signalwegs zur Folge, was fluoreszenzmikroskopisch nachverfolgbar ist. Morphologisch unterscheiden sich diese Zellen nicht von untransfizierten MDCK-Zellen. Erst nach einer Woche Behandlung mit ASS oder LiCl wurde ein deutlicher Wandel der Zellgestalt beobachtet, sodass sie nun MDCK-F3-Zellen ähnelten. Zusätzlich konnte auch eine veränderte Fluoreszenz ausgemacht werden. Diese kann als indirekter Beweis für eine Beteiligung des Raf/Ras-Wegs gewertet werden; diese Beteiligung wurde aber vermutlich über eine Modulation des Wnt-Signalweges vermittelt.

Die Interaktion des Wnt Signalweges mit dem Ras/Raf-Signalweg wird erst seit wenigen Jahren intensiv erforscht. Offensichtlich gibt es einige Schnittstellen in der Zielgenexpression, die aber zelltypspezifisch sind und noch nicht näher bekannt sind [195]. In Melanomen wurde von einem reduzierten Wnt Signalweg bei überaktiviertem Ras/Raf-Signalweg berichtet, während in CRCs ein aktivierter Wnt Signalweg zu einer Ras-Stabilisierung und somit der Aktivierung des Ras/Raf-Wegs führt. In Maus-Leberzellen führt eine  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung sogar zu einer Reduktion des Ras/Raf-Signalwegs [196]. Spezifische Vergleiche beider Signalwege in MDCK Zellen wurden bislang noch nicht durchgeführt. Allerdings wurde in MDCK Zellen ebenfalls eine EMT nach Aktivierung von ERK, einem Protein des Ras/Raf Signalweges nachgewiesen [197]. Außerdem stellten Schramek et al fest, dass in C7caMEK1 Zellen, einer MDCK-Variante, ein erhöhter MEK2 Proteinspiegel mit einer erhöhtem E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Konzentration und einem veränderten Phänotyp einhergeht [198]. Ein Zusammenspiel beider Signalwege bei EMT ist also naheliegend und die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern ebenfalls diese These.

Untersuchungen zur EMT durch Aspirin gibt es bislang nicht; lediglich in mesenchymalen Stammzellen wurde von einer Morphologieänderung durch Aspirin berichtet [159]. Da jedoch durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs eine Änderung bewiesen wurde, wäre auch eine Veränderung nach Unterdrückung des Signalwegs durch Aspirin einleuchtend. Ein potentieller Mechanismus könnte eine Inhibition des Ras/Raf-Signalwegs beinhalten, da die Zugabe von ASS zu MDCK-raf-mcherry offensichtlich eine Veränderung dieses Signalwegs, sichtbar durch Änderung der Fluoreszenz, bewirkt. Weitere Studien wären hier nötig, die zusätzlich zur Morphologieuntersuchung die Analyse der intrazellulären  $\beta$ -Catenin und Ras/Raf-Konzentrationen beinhalten.

## 5.4. Bewertung der Ergebnisse

Der Wnt Signalweg stellt ein Hauptangriffsziel in der Medikamentenforschung und –entwicklung dar. Dennoch gibt es bis heute kein etabliertes, zellbasiertes System, mit dem im großen Stil nach Wnt Inhibitoren gesucht wird. Zwar gibt es viele Ansätze, deren Anwendung beruht aber eher auf persönlichen Erfahrungen und Vorlieben, da jedes dieser Systeme Nachteile aufweist, sei es durch einen hohen Kosten- und Materialaufwand, oder durch die Notwendigkeit von spezialisierten Screeningplattformen. In der vorliegenden Arbeit wurden einige neue Ansätze und deren Anwendung im Screeningassay vorgestellt. Dabei wurde eine einfache Lösung gesucht, die ohne zusätzliches Equipment und einfach durchzuführen ist. Die Fokussierung auf Fluoreszenzreporter war damit ein logischer Schritt, da deren Anwendung simpel ist. Gerade GFP-fähige Fluoreszenzmikroskope stehen heute in vielen Laboratorien zur Verfügung. Durch Lipofektion können die entwickelten Reporter leicht in eine Vielzahl von Zellen eingebracht werden; sogar primäre Zellen wurden auf ihre Transfizierbarkeit mit dem Vektor pDisplay- $\Delta$ Top-EGFP3a und anschließende Reaktivität auf den Wnt Signalweg getestet. Im Gegensatz zu Luciferase-basierten Assays, für die Chemolumineszenz-Detektoren benötigt werden, können die transfizierten Reporterzellen auf verschiedenen Plattformen untersucht werden: die Analyse wurde sowohl im ELISA-Format, unter dem Mikroskop als Bildaufnahme als auch als Live-Cell Imaging vorgenommen. Denkbar wäre außerdem eine Analyse über Durchflusszytometrie und FACS oder High-Content-Analyse.

### 5.4.1. *Bewertung der promotorregulierten Reporter*

Obwohl ihre Wnt-Spezifität in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, eignet sich keiner der drei promotorregulierten Reporter in dieser Form für den Einsatz in Hochdurchsatzscreenings. Das Verhältnis von unstimulierten Zellen zu voll aktivierten Zellen mit LiCl beträgt hier maximal 1,5; in der Hochdurchsatzanalyse gilt ein Treffer ab einem Verhältnis von 10:1 gegenüber der Kontrolle als positiv. Die entwickelten Reporterzellen sind hier nicht aussagekräftig genug. Die Reaktivität kann unter Umständen durch den Einsatz einer anderen Zelllinie erhöht werden. Ein weiterer Faktor könnte die lange Selektionszeit von der Transfektion bis zur Durchführung der ersten Tests sein, da nachweislich die Reaktivität im Laufe der Zellkultivierung nachließ. Dieses Problem könnte durch Wahl einer anderen Transfektionsmethode, zum Beispiel durch Elektroporation, behoben werden. Insgesamt könnte die Reaktivität des Reporterengenkonstrukts durch einen zusätzlichen Promotor verstärkt werden: In jedem der entwickelten Vektoren sind drei beziehungsweise sechs TCF-Motive die einzigen Promotoren, viele Arbeitsgruppen verwenden allerdings zusätzlich einen Minimalpromotor *upstream* des Reportergens. Dies hat keine Auswirkung auf die Spezifität gegenüber dem Wnt Signalweg, könnte aber die Expression des Reportergens, in dem Fall eGFP,

deutlich verstärken. Ein weiteres Problem in dieser Hinsicht war das hohe Hintergrundsignal, das vor allem in HEKT-STE4-1-5 1C Zellen, aber auch im Verlauf der Kultivierung von HEK293-STEneu4 Zellen auftrat. Grund ist die hohe Stabilität des eGFPs nach Expression nach spontaner Aktivierung des Signalweges während der Kultivierung. In ersteren Zellen gelangt dies zum Vorteil, da dadurch das Fangen Wnt-positiver Zellen über extrazelluläre Antikörperbindung erst möglich wird. In Zweiteren hingegen führt dies zu einer Reduktion des Hintergrund/Signal-Verhältnisses. Obwohl die Zellen eindeutig auf die Aktivierung reagieren, ist die Unterscheidung nicht signifikant. Dieses Problem könnte durch die Verwendung einer destabilisierten eGFP-Variante umgangen werden. In Wirkstoffscreenings wird zudem immer eine Kombination verschiedener Assays eingesetzt, um unterschiedliche Faktoren getrennt zu evaluieren. Daher wäre der Einsatz der Reporter in einem unterstützenden Testsystem denkbar. Ebenso ist wegen der einfachen Transfizierbarkeit auch eine Anwendung in der Diagnostik in Gewebeproben möglich. Auf jeden Fall eignet er sich für die Aufklärung des Wnt-Signalweges in einzelnen, auch primären Zellen und Zelllinien.

Das Vektorkonstrukt pDisplay-STE4-1-5 stellt eine vielversprechende Neuerung dar: Hier wurden die bereits etablierte Funktionsweise der TCF-Reporter und die einfache Detektion durch Fluoreszenz mit dem ebenfalls bereits seit langer Zeit angewendeten antikörpervermittelten Sortieren von Zellen kombiniert. Die Technik, Immunzellen aus Körperflüssigkeiten mit Hilfe ihrer Oberflächenrezeptoren zu isolieren ist gängige Praxis, und hier wird der Vorteil einer einfachen, etablierten Methode durch die Spezifität des Wnt-Signalweges erweitert. Zwar ist auch hier durch die Stabilität des eGFPs ein hoher Hintergrund zu verzeichnen. Dieses Problem kann aber durch die oben diskutierten Möglichkeiten umgangen werden. Die eigentliche Methode, Wnt-positive Zellen durch das Präsentieren von eGFP auf der Außenseite der Membran zu sortieren und diese anschließend zu charakterisieren, wurde erfolgreich etabliert. Zudem wurden in den Experimenten LD-Säulen genutzt, die ursprünglich für die Selektion weniger positiver Zellen aus einem großen Pool unspezifischer Zellen entwickelt wurden. Bei Nutzung von LS-Säulen, deren Spezifikation genau invers ist, kann die Ausbeute erhöht werden und die als falsch negativ sortierten Zellen ebenfalls richtig gepoolt werden. Obwohl bisher nur für die Zelllinie HEK293T getestet, ist auch eine Anwendung in anderen Zellen, beispielsweise primären Zellen denkbar. Dadurch wäre diese Methode auch für eine Anwendung in Patientenproben geeignet, um in diesen Wnt-positive von Negativen zu trennen und gesondert weiter zu analysieren.

#### *5.4.2. Bewertung der $\beta$ -Catenin-Reporter*

Eine weitere Möglichkeit, den Wnt Signalweg in Zellen zu visualisieren, besteht im direkten Nachverfolgen des  $\beta$ -Catenins, was durch die Erstellung der Vektoren pCatenin-mCherry und pCatenin-EGFP realisiert wurde. Durch transiente Transfektion dieser Vektoren ist es möglich, potentielle Wnt-

Inhibitoren näher zu charakterisieren, die auf Ebene der  $\beta$ -Catenin-Translokation oder  $\beta$ -Catenin-Destruction Complex-Interaktion fungieren. Eine stabile Transfektion beider Vektoren war auf Dauer in den gewählten Zelllinien nicht möglich: der dauerhaft erhöhte  $\beta$ -Catenin-Spiegel verursacht Apoptose in den Zellen. Um einen physiologischeren Reporter in dieser Hinsicht zu gestalten, wäre ein Austausch des konstitutiven Promotors mit dem Wildtyp-Promotor denkbar. Auch die Kopplung des  $\beta$ -Catenins mit TCF-Motiven ist eine Möglichkeit, die Expression abzuschwächen und damit ein nativeres Bild des  $\beta$ -Catenins in der Zelle zeichnen zu können. Eine Modifikation der beiden Reporterstrukture stellt der Vektor pBcatenin-SNAP dar, mit dem eine verstärkte Fluoreszenz durch externe Färbung erreicht werden sollte. Dieser Ansatz ist misslungen, da selbst bei Färbung nicht-transfizierter Zellen eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen war. Der Vorteil dieses Ansatzes wäre, dass über den klonierten SNAP-Tag verschiedene Färbesubstanzen eingesetzt werden können, und so der gleiche Vektor in unterschiedlichen Kontexten Verwendung fände. Obgleich dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde, ist die Idee durchaus weitere Optimierungen wert.

#### *5.4.3. Bewertung des Screenings durch Bleaching*

Die umfangreichste Neuerung in dieser Arbeit stellt die Etablierung eines Screeningaufbaus durch Fluoreszenzbleaching dar. Das Ausbleichen von Fluoreszenzen für die qualitative und quantitative Analyse von Prozessen innerhalb der Zelle wird schon seit etwa 45 Jahren angewendet, und in dieser Zeit wurden zahlreiche Analysemethoden etabliert und optimiert, die sich allerdings fast ausschließlich auf die Analyse auf Einzelzellebene oder sogar einzelner Kompartimente innerhalb der Zelle beschränken. Ganze Kolonien von Zellen auszubleichen wurde bisher nur in Bakterien oder Hefen angewendet. Diese Idee auf einen Screeningassay zu übertragen stellt eine bisher noch nicht näher beschriebene Innovation dar. In ersten Versuchen zur Evaluierung wurden SW480-STeneu4 Zellen verwendet, die während eines Live-Cell Imagings unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 475 nm punktuell ausgebleicht wurden und unter Einfluss eines Inhibitors regenerierten. Diese Vorgehensweise kann zwar erfolgreich eingesetzt werden, allerdings erlaubt es keine simultane Analyse mehrerer Ansätze; die einzelnen Inhibitoren und Kontrollen müssen nacheinander ausgebleicht und die Recovery anschließend verfolgt werden. So stellte sich teilweise schon eine Recovery in einem Kompartiment ein, bevor das Bleaching aller Kompartimente der Platte abgeschlossen war. Andersherum erfolgte in Kompartimenten auch schon ein Bleaching durch die indirekte Belichtung eines benachbarten Kompartiments. Eine Aussage über die Effizienz eines Inhibitors kann also nur über Vergleich der Steigungsparameter getroffen werden und unabhängige Versuchsreihen können nicht direkt miteinander verglichen werden.

Um eine reproduzierbarere Lösung zu finden, sollte eine Plattform entwickelt werden, in der mehrere Kompartimente, bestenfalls einer 96- oder 384-Well-Platte, gleichzeitig ausgebleicht und

auch analysiert werden können. Das Problem bei dieser Entwicklung war vor allem die gleichmäßige Ausstrahlung der ganzen Platte, weshalb sich in ersten Versuchen auf eine 4-well-Kammer mit vier LEDs bei 475 nm beschränkt wurde. Die richtige Kombination aus Lichtintensität, Bestrahlungsdauer und dadurch bedingter Abstrahlungswärme, die den Zellen abträglich sein könnte, stellte einen herausfordernden Balanceakt dar. Die erste Kammer, die in Zusammenarbeit mit Kollegen der Fachhochschule Kaiserslautern entwickelt wurde, konnte problemlos bei laufender Kultivierung in einem Brutschrank eingesetzt werden, ohne negative Auswirkungen auf benachbarte Kulturen zu haben. Die Abwärme war ebenfalls so gering, dass sich keine technischen Schwierigkeiten ergaben. In diesem Aufbau wurden vier Kompartimente gleichzeitig bestrahlt, ein signifikantes Ausbleichen der grünen Fluoreszenz der SW480-STeneu4 Zellen wurde ab drei Stunden Bestrahlungsdauer bei 405 nm sichtbar, die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Die Wahl der LEDs auf kurzwelligeres Licht wurde vorgenommen, um eine schnellere Ausbleichung zu erreichen, da sich bei zu langer Bestrahlungsdauer eine hohe Abwärme in der Kultivierungskammer nicht vermeiden ließ. Sowohl dieser Aufbau als auch die Zellen sind in hohem Maße für die Suche nach Wnt-Inhibitoren im kleinen Labormaßstab geeignet.

Um das Upscaling für HTS zu realisieren, wurde in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Kaiserslautern eine spezielle Bestrahlungskammer getestet, die eine gleichmäßige Bestrahlung der gesamten Platte ermöglicht. Die Ergebnisse in dieser Kammer zeigten, dass eine Adaption auf einen höheren Maßstab möglich ist. Aufgrund der hohen Lichtleistung der Kammer ist ein Ausbleichen der Fluoreszenz bereits nach 10 Minuten sichtbar, und eine gleichmäßige Bestrahlung einer ganzen 24-Well-Platte war erfolgreich. Sie strahlt allerdings auch eine hohe Abwärme ab, sodass eine Applikation der Zellen in dieser Kammer über längere Zeit wahrscheinlich auch nicht möglich ist. In den vorgenommenen Experimenten war diese Bestrahlungsdauer ausreichend; es wurde allerdings keine Studie über die Zellvitalität bei längerer Bestrahlung aufgenommen. Die Analyse der Zellen und der Fluoreszenz erfolgte auch hier ausschließlich fluoreszenzmikroskopisch. Die Analyse mit einem Plattenphotometer wurde nicht vorgenommen. Ein Nachteil dabei bestünde in der Verwendung der Kulturplatten: Die Messungen in eigens entwickelten, schwarzen Fluoreszenzplatten sind genauer als die Messungen in herkömmlichen Kulturplatten, allerdings ist in diesen Platten keine gleichmäßige Ausleuchtung in dem oben beschriebenen Aufbau möglich.

Der beschriebene Ansatz ist in hohem Maße innovativ und richtungsweisend. Die verwendeten Zellen SW480-STeneu4 sind momentan noch nicht für eine Anwendung im HTS geeignet. Auch hier ist das Signalverhältnis zwischen Kontrolle und Inhibitor maximal 1 : 2 und somit nach klassischen Kriterien nicht für eine automatisierte Auswertung einsetzbar. Eine Optimierung wäre somit in Folgearbeiten nötig, zum Beispiel durch Verwendung anderer Zelllinien oder Optimierung des

Reporters wie oben beschrieben. Die Bleachingmethode als solche stellt allerdings eine anschauliche Neuerung dar, die in ihrer Form funktionsfähig ist. Eine Weiterentwicklung wäre für ein automatisiertes Read-out im Plattenphotometer denkbar. Hier wäre eine Überlegung der Einsatz von organischen OLED-Platten, womit eine gleichmäßige Ausleuchtung machbar wäre. Der Vorteil dieser Technik ist zudem die geringe Abwärme und auch der unkomplizierte Austausch verschiedener Plattenformate (siehe Zeichnung Abbildung 31). Dieser Aufbau ist zurzeit jedoch noch nicht realisierbar, da die Produktion von OLED-Folien noch sehr teuer und fehleranfällig ist. Eine Alternative könnte eine LED-Platte darstellen, die ähnlich wie in der Zeichnung unterhalb der Kulturplatten angesetzt wird.

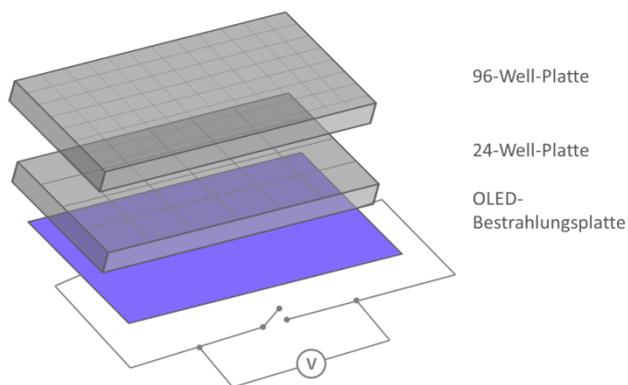


Abbildung 31: Schematische Skizze eines hypothetischen Bestrahlungsaufbaus mit OLED-Platte: eine ausreichend lichtintensive OLED-Folie bildet das Kernstück, je nach Applikation kann entweder eine 96-Well- oder eine 24-Well Platte verwendet werden. Hierbei wäre auch die Verwendung schwarzer Fluoreszenzplatten möglich.

#### 5.4.4. Bewertung der Untersuchungen zur Morphologieveränderung von MDCK-Zellen

Die Untersuchung von Morphologieveränderungen von MDCK-Zellen beruhten auf der Beobachtung, dass diese Zellen, sobald sie dem GSK3 $\beta$ -Inhibitor LiCl ausgesetzt wurden, ihre enge, mosaikartige Morphologie im Zellverband veränderten und ein spindelförmiges Aussehen in unterschiedlichem Maße annahmen. Diese Versuche wurden auf Aspirin mit verschiedenen MDCK-Varianten ausgeweitet. Die Ergebnisse deuten zum einen auf eine Beteiligung der Proteine  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin hin, zum anderen auf eine Kreuzreaktivität mit dem Ras/Raf-Weg. Die Beteiligung des Ras/Raf-Signalweges wird vermutlich durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges beeinflusst. Da die Verbindung der beiden Signalwege bereits untersucht wird, stellt diese Studie ein weiteres Mosaik in dieser Forschung dar. Die Mitwirkung beider Signalwege wurde dabei direkt und indirekt nachgewiesen, eine genaue Prüfung der einzelnen, beteiligten Faktoren wäre in einer weiterführenden Studie notwendig. Dazu wären im Einzelnen Färbungen der Proteine  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin und damit der *adherens junctions* notwendig. Eine Expressionsanalyse ausgewählter Zielgene über RT-PCR wäre ebenfalls eine Möglichkeit, die genauen Prozesse aufzuschlüsseln.

#### *5.4.5. Fazit der Arbeit*

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten Methoden auf zellulärer Basis entwickelt werden, um den Wnt Signalweg zu visualisieren und weitergehend, einen fluoreszenzbasierten Zellassay zu entwickeln, der für die Suche nach potentiellen Modulatoren des Wnt Signalweges im Hochdurchsatzscreening geeignet ist. Die einzelnen Schritte und Meilensteine der Zielsetzung wurden während der Arbeit erreicht. Es wurden insgesamt fünf Reportergenvektoren entwickelt, die den Aktivitätsstatus des Wnt Signalweges in Zelllinien anzeigen und die zum einen für die Suche nach Wnt-Modulatoren, zum anderen zur Charakterisierung spezieller Wnt-Inhibitoren eingesetzt werden können. Die Vektoren und Zellen sind sowohl in einem Assay, als auch in Live-Cell Imaging-Analysen anwendbar. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, mit der Wnt-positive Zellen von Zellen mit inaktivem Signalweg getrennt und anschließend weiter kultiviert werden können. Diese Trennung beruht auf einem antikörpervermitteltem, magnetischen Fishing von eGFP auf der Membran Wnt-positiver Zellen nach Transfektion mit einem der Reportergenkonstrukte. Diese Methode hat neben dem Einsatz in der Forschung auch ein hohes Potential für die Anwendung im diagnostischen Bereich bei der Analyse von Patientengewebeproben. Ferner wurde ein neuartiger Screeningansatz entwickelt, die eine einfache Suche nach Wnt-Inhibitoren erlaubt. Durch Ausbleichen der Fluoreszenz in einer ganzen Kulturplatte und anschließender Messung der Fluoreszenzrecovery ist eine simple, kostengünstige und schnelle Suche nach Wnt-Inhibitoren und gleichzeitig die Bestimmung deren Inhibitionseffizienz möglich. Diese Innovation kann sich in Zukunft potentiell zu einer eigenen Screeningplattform auch für weitere Signalwege etablieren.

## 5.5. Ausblick

Die Entwicklung potentieller Wirkstoffkandidaten bis hin zu in der Krebstherapie tatsächlich einsetzbaren Medikamenten ist ein mehrstufiger Prozess, der eine Vielzahl von Voruntersuchungen und –prüfungen erfordert und in dem eine Kombination verschiedener Techniken zum Tragen kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen damit eine Lücke und fügen dem Portfolio an Testsystemen weitere Werkzeuge hinzu, mit denen der Weg vom Wirkstoff in die klinische Medizin erleichtert, beschleunigt und somit auch insgesamt günstiger gestaltet werden kann. In den zahlreichen Screeningassays der letzten zwanzig Jahre wurden hunderte potentielle Wirkstoffe aufgespürt, von denen nur ein kleiner Bruchteil den Weg in die klinische Anwendung fand. Ein Grund dafür ist, dass viele Wirkstoffe eine spezifische Wirkung für ein einzelnes Ziel zeigen, welches mitunter eine Nische in der Behandlung von wenigen Krebspatienten darstellt, aber seine Charakterisierung und Produktion im großen Maßstab für ein Pharmaunternehmen nicht rentabel ist. Inzwischen aber akzeptiert, dass das Ziel der Therapie von Krebspatienten nicht ist, ein einziges Medikament für jede Form von Krebs zu finden. Ebenso wie der Patient ein Individuum ist, reagiert jeder Tumor anders, abhängig von dem Gewebe, aus dem er entstand, seinem Umfeld, seiner Entwicklung und auch dem persönlichen Umfeld des Patienten. Um unter diesem Aspekt die verschiedenen Hits aus den unzähligen Screenings auszuschöpfen wird in den letzten Jahren vermehrt in die Entwicklung der sogenannten personalisierten Medizin investiert. Dahinter verbirgt sich eine individuelle Abstimmung einzelner Wirkstoffe auf den Patienten und seine Krebsform. Diese Entwicklung wird möglicherweise eine intensive Suche nach diagnostischen Methoden mit sich bringen, die zu Lasten der Suche nach neuen Wirkstoffen gehen wird. Statt der Suche nach dem absolutem Wirkstoff wird die Charakterisierung des Patienten im Mittelpunkt stehen und dessen individuelle Reaktivität auf einzelne Medikamente. Erste Fortschritte in dieser Hinsicht zeigt die Sequenzierung des Genoms bis hin auf die Ebene einer einzelnen Krebszelle, um ein Bild der möglichen Ziele zu zeichnen und andere Therapien von vorneherein auszuschließen. Weitere Entwicklungen der personalisierten Diagnostik betreffen die erweiterte Bandbreite an möglichen Tumormarkern und auch an *in vitro* Testsystemen auf Tumorgewebe und –zellen. Die vollständige personalisierte Medizin ist aufgrund der hohen Kosten heute noch keine Realität, der Weg dieser Entwicklung ist aber bereits vorgezeichnet. In diesem Zusammenhang stellt die vorliegende Dissertationsarbeit nützliche Werkzeuge vor, die eine Brücke zwischen Methoden der Wirkstofffindung und dem Einsatz neuer Methoden und Reagenzien in der Diagnostik schlagen. Die diskutierten Ergebnisse sind hoch aktuell und werden auch in Hinblick auf zukünftige Entwicklungen wertvoll sein

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherence junctions
APC	Adenomatous polyposis coli
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin
BCL	B-cell lymphoma
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
CamKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
cDNA	Cyclische DNA
CIMP	CpG Island methylates phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CIP	Calf-intestine phosphatase
CK1	casein kinase 1
COX-2	fatty acid cyclooxygenase 2
CRC	Colectal cancer
DAG	1,2-Diacylglycerol
Dkk	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVL	Disheveled
EDTA	Ethylenediamine tetra acetylic acid
eGFP	Enhanced GFP
FACS	Fluorescence-activated Cell separation
FCS	Fetal calf serum
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fz	Frizzled
G	Guanosin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HCS	High-Content Screening
HDAC	Histon-Deacetylasen

HEK	Human embryonal kidney
HTS	High-Throuput Screening
IP3	Inositoltriphosphat
IWP	Inhibitor of wnt production
IWR	Inhibitor of Wnt response
Kbp	Kilobasenpaaren
kDa	kiloDalton
LB	Lysogeny Broth
LED	Light-emitting diode
LEF	Lymphoid enhancer factor
LRP	Low-density lipoprotein-receptor-related protein
MACS	Magnetic absorbed cell separation
MDCK	madin darby canine kidney
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAA	Non-essential amino acids
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
PCP	Planar cell polaryty
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPAR $\delta$	Peroxisome-proliferator-activated rezeptor
RhoA	Ras-Homolog, Mitglied A
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
ROR2	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	rounds per minute
Ser	Serin
TAE	Triessigsäure
TCF	T-cell factor
Thr	Threonin
TOP	Tcf optimal binding site
Tyr	Tyrosin

## 6.2. Technische Daten des Grundvektors pDisplay

Aus dem Application Data Sheet „pDisplay Cloning“ von Invitrogen

### Cloning into pDisplay™, Continued

**Multiple Cloning Site of pDisplay™** Below is the multiple cloning site for pDisplay™. Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing.

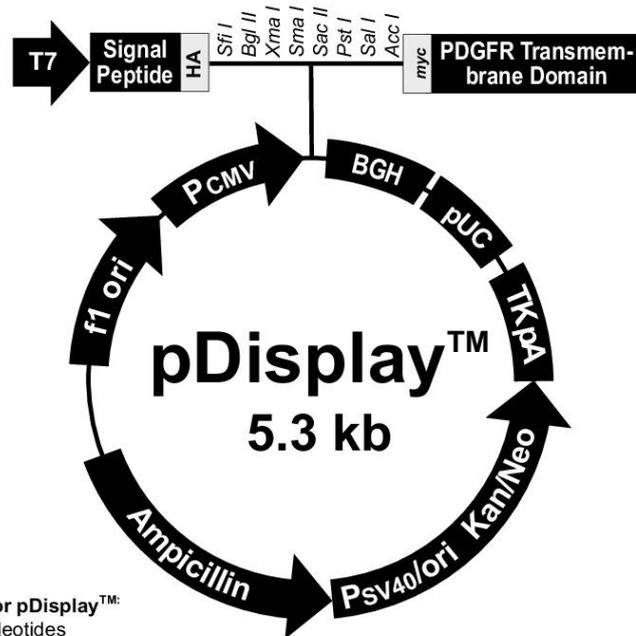
```

      ↓ 5' end of hCMV promoter/enhancer
1   GCGCGCGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG
61  TTCATAGCCC ATATATGGAG TCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAATGGC CCGCCTGGCT
121 GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
181 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGACTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG
241 CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA
361 TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC
421 GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
      ↑
481 GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT
      CAAT           TATA           3' end of CMV ↓
541 TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
      Putative transcriptional start           T7 promoter/priming site
601 TAACTAGAGA ACCCACTGCT TACTGGCTTA TCGAAATTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA
661 CCCAAGCTTG GTACCAGACT CGGATCCACT AGTAACGGCC GCCAGTGTGC TGAATTCCG
721 CTTGGGGATA TCCACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG
      Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu
      hemagglutinin A epitope
773 CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT
      Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
      Sfi I Bgl II Xma I Sma I Sac II Pst I Acc I
821 TAT GCT GGG GCC CAGCCGGCCA GATCTCCCGG GATCCGCGG CTGCAGGTC GAC
      Tyr Ala
      myc epitope           PDGFR transmembrane domain (5' end)
874 GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AATGCTGTGG GCCAGGACAC
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu ...
924 GCAGGAGGTC ATCGTGGTGC CACACTCCTT GCCCTTAAAG GTGGTGGTGA TCTCAGCCAT
984 CCTGGCCCTG GTGGTGCTCA CCATCATCTC CTTATCATC CTCATCATGC TTTGGCAGAA
      PDGFR (3' end)
1044 GAAGCCACGT TAGGCGGCCG CTCGAGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
1104 TCTGTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTG
      BGH poly (A) addition site
1164 CTTTCTAAT AAAATGAGGA
  
```

## pDisplay™ Vector, Continued

### Map of pDisplay™

The figure below shows the features of pDisplay™. The complete sequence of pDisplay™ is available for downloading from our Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or by contacting Technical Service (see page 9). Details of the multiple cloning site are shown on page 5.



#### Comments for pDisplay™: 5325 nucleotides

CMV promoter: bases 1-596  
T7 promoter: bases 638-657  
Murine Ig kappa-chain V-J2-C signal peptide: bases 737-799  
Hemagglutinin A epitope: bases 800-826  
Multiple Cloning Site: bases 827-873  
myc epitope: bases 874-903  
PDGFR transmembrane domain: bases 907-1056  
Bovine growth hormone polyadenylation signal: bases 1069-1288  
pUC origin: bases 1378-2051  
Thymidine kinase polyadenylation site: bases 2458-2187  
Neomycin/Kanamycin resistance gene: bases 3421-2366  
SV40 origin and promoter: bases 3797-3456

## 6.3. Spezifikationen der Bestrahlungsaufbauten

### 6.3.1. LED-Kammer für den Gebrauch im Brutschrank

- 4x LED 475 nm bzw. 405 nm
- 12 V Betriebsspannung pro LED
- Abstandshalter 25 mm
- Elektronik eingefügt in ein Alu-Druckguss-Gehäuse mit den Abmaßen 115x64x55mm, Luftdicht verschlossen

### 6.3.2. Spezifikation des Bestrahlungsaufbaus der TU Kaiserslautern

## LED405-66-60 epoxy lens type violet color illuminator

LED405-66-60 is a wide viewing and extremely high output power illuminator assembled with a total of 60 high efficiency InGaN diode chips, mounted on a metal stem TO-66 with AlN ceramics and covered with double coated clear silicone and epoxy resin. These devices are designed for high current operation with proper heat sinking to improve thermal conductive efficiency.

#### ◆ Features

- 1) High reliability
- 2) Compact (TO-66) package
- 3) High output power at 405 nm

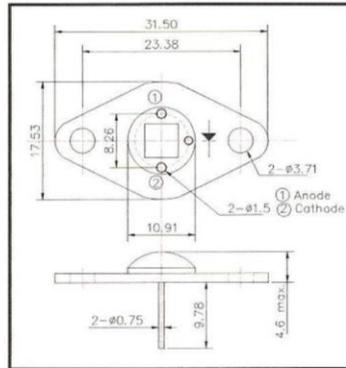
#### ◆ Applications

- 1) high intensity lighting source

#### ◆ Specifications

- 1) Product name violet color illuminator
- 2) Spec. No. LED405-66-60
- 3) Chip
  - (1) Material InGaN
  - (2) Peak wavelength 405 nm
- 4) Package
  - (1) Stem TO-66 stem with AlN
  - (2) Lens Clear silicone and epoxy lens

#### ◆ Outer dimension (Unit: mm)



#### ◆ Absolute Maximum Ratings

Item	Symbol	Maximum Rated Value	Unit	Ambient Temp.
Power Dissipation	$P_D$	4.0	W	$T_a = 25^\circ\text{C}$
Forward Current	$I_F$	300	mA	$T_a = 25^\circ\text{C}$
Pulse Forward Current	$I_{FP}$	1200	mA	$T_a = 25^\circ\text{C}$
Reverse Voltage	$V_R$	25	V	$T_a = 25^\circ\text{C}$
Operating Temperature	$T_{OPR}$	-20 ~ +80	$^\circ\text{C}$	
Storage Temperature	$T_{STG}$	-30 ~ +110	$^\circ\text{C}$	
Soldering Temperature	$T_{SOL}$	240	$^\circ\text{C}$	

‡Pulse Forward Current condition: Duty = 1% and Pulse Width = 1  $\mu\text{s}$ .

‡Soldering condition: Soldering condition must be completed within 3 seconds at 260 $^\circ\text{C}$

#### ◆ Electro-Optical Characteristics

Item	Symbol	Condition	Minimum	Typical	Maximum	Unit
Brightness	$I_v$	$I_F = 240\text{ mA}$		---		cd
Luminous Flux	$\Phi_v$	$I_F = 240\text{ mA}$		---		lm
Total Radiated Power	$P_o$	$I_F = 240\text{ mA}$		300		mW
Forward Voltage	$V_F$	$I_F = 240\text{ mA}$		18.0		V
Reverse Current	$I_R$	$I_R = 10\text{ }\mu\text{A}$	50			V
Peak Wavelength	$\lambda_P$	$I_F = 240\text{ mA}$	400	405	410	nm
Half Width	$\Delta\lambda$	$I_F = 240\text{ mA}$		20		nm
Viewing Half Angle	$\theta_{1/2}$	$I_F = 240\text{ mA}$		$\pm 60$		deg

‡Heat sink is required thermal resistance <8 K/W

ROITHNER LASERTECHNIK, A-1040 Vienna, Austria, Schoenbrunner Strasse 7  
 Tel.: +43-1-586 52 43 - 0, Fax.: +43-1-586 52 43 44  
 e-mail: office@roithner-laser.com, http://www.roithner-laser.com

## 6.4. Danksagung

Von der Idee bis zur Fertigstellung dieser Arbeit war es ein langer Weg, den ich niemals hätte allein und ohne Hilfe bewältigen können. Daher möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf die eine oder andere Weise auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Oliver Müller für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, die Betreuung und Unterstützung und die vielen damit verbundenen Gespräche und den unerschütterlichen Optimismus auch in scheinbaren Sackgassen. Vor allem aber für die Möglichkeit, alles auszuprobieren, was mir in den Sinn kam und so diese Arbeit zu etwas durch und durch Eigenem zu gestalten.

Mike Heilemann möchte ich für die spontane Bereitschaft danken, meine Arbeit an der Universität Würzburg zu betreuen und die vielen konstruktiven Gespräche und Anstöße zu neuen Ideen, aber auch der kritischen Auseinandersetzung mit meiner Daten.

Meiner Kollegin Patricia Reischmann gilt ein herzlicher Dank für die intensive, enge Zusammenarbeit in den dreieinhalb Jahren, sowohl im als auch außerhalb des Labors. Ich wünsche Dir viel Erfolg für Deine Arbeit!

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen der FH Kaiserslautern bedanken, die mir eine wunderbare Zeit an der Fachhochschule Kaiserslautern ermöglicht haben, sei es durch konstruktive Diskussionen, durch technische und informelle Hilfe, durch organisatorischen Beistand in den ersten Wochen oder durch die Hinführung zu den wesentlichen Dingen: nach dem Labor: mein Bürokollege Dieter Koppenhöfer, Felix Kettenbaum, Tobias Oberbillig, Jan-Erik Kettner, Rainer Lilischkis und allen anderen, die mir oft in letzter Minute noch aus einer Notlage geholfen oder einfach das Leben am Campus angenehmer gestaltet haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem lieben Carsten für die unendliche Geduld, Hingabe und Hilfe, wenn ich mal wieder stundenlang geredet habe, wovon du kein Wort verstanden hast!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung bedanken – so zäh die Zeit war, nun ist es geschafft.

## 6.5. Literaturnachweise

- [1] R. van Amerongen and R. Nusse, "Towards an integrated view of Wnt signaling in development," *Development*, vol. 136, no. 19, pp. 3205–3214, 2009.
- [2] L. Ring, I. Peröbner, M. Karow, M. Jochum, P. Neth, and A. Faussner, "Reporter gene HEK 293 cells and WNT/Frizzled fusion proteins as tools to study WNT signaling pathways," *Biological chemistry*, vol. 392, no. 11, pp. 1011–20, Nov. 2011.
- [3] A. De, "Wnt / Ca<sup>2+</sup> signaling pathway : a brief overview," *Acta Biochimica et Biophysica Hungarica*, vol. 43, no. 10, pp. 745 – 756, 2011.
- [4] T. P. Rao and M. Kühl, "An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more.," *Circulation Research*, vol. 106, no. 12, pp. 1798–1806, 2010.
- [5] X. H. MacDonald, Bryan T, Keiko tamai, "Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases," *Dev. Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 9–26, 2010.
- [6] K. M. Cadigan and Y. I. Liu, "Wnt signaling: complexity at the surface.," *Journal of cell science*, vol. 119, no. Pt 3, pp. 395–402, Feb. 2006.
- [7] D. Kimelman and W. Xu, "Beta-Catenin Destruction Complex: Insights and Questions From a Structural Perspective.," *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7482–91, Dec. 2006.
- [8] C. L. Bos, L. L. Kodach, G. R. van den Brink, S. H. Diks, M. M. van Santen, D. J. Richel, M. P. Peppelenbosch, and J. C. H. Hardwick, "Effect of aspirin on the Wnt/beta-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A.," *Oncogene*, vol. 25, no. 49, pp. 6447–56, Oct. 2006.
- [9] R. C. Arend, A. I. Londoño-Joshi, J. M. Straughn, and D. J. Buchsbaum, "The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: A review.," *Gynecologic oncology*, pp. 1–8, Oct. 2013.
- [10] A. Vlad, S. Röhrs, L. Klein-Hitpass, and O. Müller, "The first five years of the Wnt targetome.," *Cellular Signalling*, vol. 20, no. 5, pp. 795–802, 2008.
- [11] L.-Y. Tang, N. Deng, L.-S. Wang, J. Dai, Z.-L. Wang, X.-S. Jiang, S.-J. Li, L. Li, Q.-H. Sheng, D.-Q. Wu, L. Li, and R. Zeng, "Quantitative phosphoproteome profiling of Wnt3a-mediated signaling network: indicating the involvement of ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit phosphorylation at residue serine 20 in canonical Wnt signal transduction.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 6, no. 11, pp. 1952–67, Nov. 2007.
- [12] A. Friedman and N. Perrimon, "Genome-wide high-throughput screens in functional genomics.," *Current opinion in genetics & development*, vol. 14, no. 5, pp. 470–6, Oct. 2004.
- [13] N. C. I. and A. Christian Hödar, Rodrigo Assar, Marcela Colombres, Andrés Aravena, Leonardo Pavez, Mauricio González, ServetMartínez, "Genome-wide identification of new Wnt/ $\beta$ -

- catenin target genes in the human genome using CART method," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 11, pp. 348–363, 2010.
- [14] G. S. Yochum, R. Cleland, and R. H. Goodman, "A genome-wide screen for beta-catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls c-Myc gene expression.," *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 24, pp. 7368–79, Dec. 2008.
- [15] H. H. Luu, R. Zhang, R. C. Haydon, E. Rayburn, Q. Kang, W. Si, J. K. Park, H. Wang, Y. Peng, W. Jiang, and T.-C. He, "Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target.," *Current cancer drug targets*, vol. 4, no. 8, pp. 653–71, Dec-2004.
- [16] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, and X. He, "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.," *Cell*, vol. 108, no. 6, pp. 837–847, 2002.
- [17] B. M. Gumbiner, "Regulation of cadherin adhesive activity.," *The Journal of cell biology*, vol. 148, no. 3, pp. 399–404, 2000.
- [18] M. Johnson, M. Sharma, C. Jamieson, J. M. Henderson, M. T. S. Mok, L. Bendall, and B. R. Henderson, "Regulation of beta-catenin trafficking to the membrane in living cells.," *Cellular signalling*, vol. 21, no. 2, pp. 339–48, Feb. 2009.
- [19] M. Sharma, C. Jamieson, M. Johnson, M. P. Molloy, and B. R. Henderson, "Specific armadillo repeat sequences facilitate  $\beta$ -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 2, pp. 819–31, 06-Jan-2012.
- [20] M. Sharma, L. Leung, M. Brocardo, J. Henderson, C. Flegg, and B. R. Henderson, "Membrane localization of adenomatous polyposis coli protein at cellular protrusions: targeting sequences and regulation by beta-catenin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 25, pp. 17140–9, Jun. 2006.
- [21] A. I. Ivanov, A. Nusrat, and C. A. Parkos, "Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment.," *Molecular biology of the cell*, vol. 15, no. 1, pp. 176–188, 2004.
- [22] Y. Kam and V. Quaranta, "Cadherin-bound beta-catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between beta-catenin pools.," *PloS one*, vol. 4, no. 2, p. e4580, Jan. 2009.
- [23] C. Thrasivoulou, M. Millar, and A. Ahmed, "Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of  $\beta$ -catenin into the nucleus: a convergent model of Wnt/Ca<sup>2+</sup> and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways.," *The Journal of biological chemistry*, Oct. 2013.
- [24] T. C. Camilli and A. T. Weeraratna, "Striking the target in Wnt-y conditions: intervening in Wnt signaling during cancer progression.," *Biochemical pharmacology*, vol. 80, no. 5, pp. 702–11, Sep. 2010.

- [25] S. McDonald and A. Silver, "The opposing roles of Wnt-5a in cancer," *British journal of cancer*, vol. 101, no. 2, pp. 209–214, 2009.
- [26] J. R. Miller and R. T. Moon, "Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis.," *Genes & Development*, vol. 10, no. 20, pp. 2527–2539, Oct. 1996.
- [27] R. van Amerongen, A. Mikels, and R. Nusse, "Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors.," *Science signaling*, vol. 1, no. 35, p. re9, Jan. 2008.
- [28] L. Jia, C. Miao, Y. Cao, and E. K. Duan, "Effects of Wnt proteins on cell proliferation and apoptosis in HEK293 cells.," *Cell biology international*, vol. 32, no. 7, pp. 807–13, Jul. 2008.
- [29] C. Fuerer, R. Nusse, and D. ten Berge, "Wnt Signalling in development and disease," *EMBO reports*, no. December 2007, pp. 1–5, 2008.
- [30] C. Jamieson, M. Sharma, and B. Henderson, "Regulation of  $\beta$ -Catenin Nuclear Dynamics by GSK-3 $\beta$  Involves a LEF-1 Positive Feedback Loop," *Traffic*, no. 12, pp. 983–999, 2011.
- [31] A. J. Mikels and R. Nusse, "Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits b-Catenin – TCF Signaling Depending on Receptor Context," *Context*, vol. 4, no. 4, 2006.
- [32] J. Apfel, J. R. Parikh, P. Reischmann, R. M. Ewing, O. Müller, Y. Xia, and I. Dominguez, "The Wnt Pathway in Cancer," in in *Systems Biology of Cancer*, 2013.
- [33] H. Clevers, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.," *Cell*, vol. 127, no. 3, pp. 469–480, 2006.
- [34] S.-G. Hwang, S.-S. Yu, S.-W. Lee, and J.-S. Chun, "Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway.," *FEBS letters*, vol. 579, no. 21, pp. 4837–42, Aug. 2005.
- [35] S. Ziegler, S. Röhrs, L. Tickenbrock, T. Möröy, L. Klein-Hitpass, I. R. Vetter, and O. Müller, "Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation.," *The FEBS journal*, vol. 272, no. 7, pp. 1600–15, Apr. 2005.
- [36] S. Handeli and J. A. Simon, "A small-molecule inhibitor of Tcf /  $\beta$  -catenin signaling down-regulates PPAR  $\gamma$  and PPAR  $\delta$  activities," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 7, no. 3, pp. 521–529, 2008.
- [37] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation.," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [38] S. Al-Sohaily, A. Biankin, R. Leong, M. Kohonen-Corish, and J. Warusavitarne, "Molecular pathways in colorectal cancer.," *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 27, no. 9, pp. 1423–31, Sep. 2012.

- [39] M. J. Waldner and M. F. Neurath, "The molecular therapy of colorectal cancer.," *Molecular aspects of medicine*, vol. 31, no. 2, pp. 171–8, Apr. 2010.
- [40] S. Baker, S. Markowitz, E. Fearon, J. Willson, and B. Vogelstein, "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53," *Science*, vol. 249, no. 4971, pp. 912–915, 1990.
- [41] B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos, "Genetic alterations during colorectal-tumor development.," *The New England journal of medicine*, vol. 319, no. 9, pp. 525–532, 1988.
- [42] B. Lustig and J. Behrens, "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development.," *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 129, no. 4, pp. 199–221, Apr. 2003.
- [43] C. Y. Logan and R. Nusse, "The Wnt signaling pathway in development and disease.," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 20, pp. 781–810, Jan. 2004.
- [44] B. D. White, A. J. Chien, and D. W. Dawson, "Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers.," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 2, pp. 219–32, Feb. 2012.
- [45] N. R. Gough, "Focus issue: Wnt and  $\beta$ -catenin signaling in development and disease.," *Science signaling*, vol. 5, no. 206, p. eg2, 2012.
- [46] H. Zhu, M. Mazor, Y. Kawano, M. M. Walker, H. Y. Leung, K. Armstrong, J. Waxman, and R. M. Kypta, "Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor.," *Cancer research*, vol. 64, no. 21, pp. 7918–26, Nov. 2004.
- [47] L. Thorstensen, G. E. Lind, T. Løvig, C. B. Diep, G. I. Meling, T. O. Rognum, and R. a Lothe, "Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability.," *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 7, no. 2, pp. 99–108, Feb. 2005.
- [48] M. Simon, V. L. Grandage, D. C. Linch, and A. Khwaja, "Constitutive activation of the Wnt /  $\beta$ -catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia," *Oncogene*, pp. 2410–2420, 2005.
- [49] T. KIESSLICH, B. ALINGER, G. W. WOLKERSDORFER, M. OCKER, D. NEUREITER, and F. BERR, "Active Wnt signalling is associated with low differentiation and high proliferation in human biliary tract cancer in vitro and in vivo and is sensitive to pharmacological inhibition," *International journal of oncology*, vol. 36, no. 1, pp. 49–58, 2010.
- [50] N. S. Fearnhead, M. P. Britton, and W. F. Bodmer, "The abc of apc," *Human Molecular Genetics*, vol. 10, no. 7, p. 721, 2001.
- [51] L. Yan, L. D. Coletta, K. L. Powell, J. Shen, H. Thames, C. M. Aldaz, M. C. MacLeod, and R. Oshima, "Activation of the Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in ATF3-Induced Mammary Tumors," *PloS one*, vol. 6, no. 1, pp. 27272–27280, 2011.

- [52] M. Johnson, "Diseases of Wnt signaling," *Reviews in endocrine & metabolic*, no. August, pp. 41–49, 2006.
- [53] N. Fujii, L. You, Z. Xu, K. Uematsu, J. Shan, B. He, I. Mikami, L. R. Edmondson, G. Neale, J. Zheng, R. K. Guy, and D. M. Jablons, "An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth.," *Cancer research*, vol. 67, no. 2. pp. 573–9, Jan-2007.
- [54] J. Veeck and E. Dahl, "Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1825, no. 1, pp. 18–28, Jan. 2012.
- [55] W. Yue, Q. Sun, S. Dacic, R. J. Landreneau, J. M. Siegfried, J. Yu, and L. Zhang, "Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer.," *Carcinogenesis*, vol. 29, no. 1, pp. 84–92, 2008.
- [56] G. Pannone, P. Bufo, A. Santoro, and R. Franco, "WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors.," *Oncology ...*, vol. 24, pp. 1035–1041, 2010.
- [57] N. Janssens, M. Janicot, and T. Perera, "The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery," *Investigational New Drugs*, vol. 24, no. 4, pp. 263–280, 2006.
- [58] R. Bao, T. Christova, S. Song, S. Angers, X. Yan, and L. Attisano, "Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells.," *PLoS one*, vol. 7, no. 11, p. e48670, Jan. 2012.
- [59] J. Luo, J. Chen, Z.-L. Deng, X. Luo, W.-X. Song, K. a Sharff, N. Tang, R. C. Haydon, H. H. Luu, and T.-C. He, "Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 87, no. 2, pp. 97–103, Feb. 2007.
- [60] K. Schrör, "Pharmacology and cellular/molecular mechanisms of action of aspirin and non-aspirin NSAIDs in colorectal cancer.," *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, vol. 25, no. 4–5, pp. 473–84, Aug. 2011.
- [61] E. Greenspan and J. Madigan, "Ibuprofen inhibits activation of nuclear  $\beta$ -catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK-3 $\beta$ ," *Cancer Prevention ...*, vol. 1, pp. 161–171, 2011.
- [62] Z. Shi, X. Qian, L. Li, J. Zhang, S. Zhu, J. Zhu, L. Chen, K. Zhang, L. Han, S. Yu, P. Pu, T. Jiang, and C. Kang, "Nuclear Translocation of  $\beta$ -catenin is Essential for Glioma Cell Survival.," *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 15-Mar-2012.
- [63] B. Chen, M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C.-W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen, and L. Lum, "Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer.," *Nature Chemical Biology*, vol. 5, no. 2, pp. 100–107, 2009.

- [64] L. Zhou, N. An, R. C. Haydon, Q. Zhou, H. Cheng, Y. Peng, W. Jiang, H. H. Luu, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park, B. Breyer, and T.-C. He, "Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity.," *Cancer Letters*, vol. 193, no. 2, pp. 161–170, 2003.
- [65] M. Dovizio, A. Bruno, S. Tacconelli, and P. Patrignani, "Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent," *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, vol. 191, pp. 39–65, 2012.
- [66] S. Tanaka, K. Terada, and T. Nohno, "Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells.," *Journal of molecular signaling*, vol. 6, no. 1, p. 12, Oct. 2011.
- [67] K. a Chuang, C. H. Lieu, W. J. Tsai, M. H. Wu, Y. C. Chen, J. F. Liao, C. C. Wang, and Y. C. Kuo, "Evaluation of anti-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling agents by pGL4-TOP transfected stable cells with a luciferase reporter system.," *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, vol. 43, no. 10, pp. 931–41, Oct-2010.
- [68] F. Hollande, J. Pannequin, and D. Joubert, "The long road to colorectal cancer therapy: searching for the right signals.," *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, vol. 13, no. 1–2, pp. 44–56, 2010.
- [69] M. Lepourcelet, Y.-N. P. Chen, D. S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A. W. Wood, and R. a Shivdasani, "Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ $\beta$ -catenin protein complex.," *Cancer cell*, vol. 5, no. 1, pp. 91–102, Jan. 2004.
- [70] W. Wei, M. Chua, S. Grepper, and S. So, "Small molecule antagonists of Tcf4/ $\beta$ -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, pp. 2426–2436, 2010.
- [71] M. Bordonaro, D. L. Lazarova, and A. C. Sartorelli, "The activation of  $\beta$ -catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors.," *Experimental cell research*, vol. 313, no. 8, pp. 1652–66, May 2007.
- [72] P. S. Tanwar, T. Kaneko-Tarui, L. Zhang, P. Rani, M. M. Taketo, and J. Teixeira, "Constitutive WNT/ $\beta$ -catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis.," *Biology of reproduction*, vol. 82, no. 2, pp. 422–32, Feb. 2010.
- [73] K. Kim, K. M. Pang, M. Evans, and E. D. Hay, "Overexpression of  $\beta$ -Catenin Induces Apoptosis Independent of Its Transactivation Function with LEF-1 or the Involvement of Major G1 Cell Cycle Regulators," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11, no. 10, pp. 3509–3523, 2000.
- [74] X. Xia and S. Wong, "Concise Review: A High-Content Screening Approach to Stem Cell Research and Drug Discovery," *Stem Cells*, vol. 30, pp. 1800–1807, 2012.

- [75] J. O. Jones and M. I. Diamond, "Design and implementation of cell-based assays to model human disease.," *ACS chemical biology*, vol. 2, no. 11, pp. 718–24, Nov. 2007.
- [76] A. Smith, "Screening for drug discovery: the leading question," *Nature*, vol. 48, pp. 453–459, 2002.
- [77] M. Kelkar and A. De, "Bioluminescence based in vivo screening technologies.," *Current opinion in pharmacology*, vol. 12, no. 5, pp. 592–600, Oct. 2012.
- [78] F. Zanella, J. B. Lorens, and W. Link, "High content screening: seeing is believing.," *Trends in biotechnology*, vol. 28, no. 5, pp. 237–45, May 2010.
- [79] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, and G. P. C. Drummen, "Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 17, no. 4, pp. 4047–132, Jan. 2012.
- [80] B. B. BRODIE, S. UDENFRIEND, and J. V TAGGART, "Analysis of basic organic compounds in biological tissues; coupling with diazonium salts.," *Federation proceedings*, vol. 5, no. 1 Pt 2, p. 125, Jan. 1946.
- [81] B. B. BRODIE and S. UDENFRIEND, "Analysis of basic organic compounds in biological tissues; conversion to fluorescent compounds.," *Federation proceedings*, vol. 5, no. 1 Pt 2, p. 125, Jan. 1946.
- [82] O. Ronneberger, D. Baddeley, F. Scheipl, P. J. Verveer, H. Burkhardt, C. Cremer, L. Fahrmeir, T. Cremer, and B. Joffe, *Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls.*, vol. 16, no. 3. 2008, pp. 523–62.
- [83] M. Heilemann, "Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit.," *Journal of biotechnology*, vol. 149, no. 4, pp. 243–51, Sep. 2010.
- [84] S. J. Sahl and W. Moerner, "Super-resolution fluorescence imaging with single molecules.," *Current opinion in structural biology*, vol. 23, no. 5, pp. 778–87, Oct. 2013.
- [85] X. Zhou and S. T. C. Wong, "High Content Cellular Imaging for Drug Development," *IEEE Signal Proceeding Magazine*, no. March, pp. 170–174, 2006.
- [86] W. W. Ward and S. H. Bokman, "Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein.," *Biochemistry*, vol. 21, no. 19, pp. 4535–40, Sep. 1982.
- [87] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 263, no. 5148, pp. 802–5, Feb. 1994.

- [88] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 273, no. 5280, pp. 1392–5, Sep. 1996.
- [89] V. C. Coffman and J.-Q. Wu, "Counting protein molecules using quantitative fluorescence microscopy.," *Trends in biochemical sciences*, vol. 37, no. 11, pp. 499–506, Nov. 2012.
- [90] A. Ferrer-Vaquer, A. Piliszek, G. Tian, R. J. Aho, D. Dufort, and A.-K. Hadjantonakis, "A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the mouse.," *BMC developmental biology*, vol. 10, p. 121, Jan. 2010.
- [91] S. M. Meilhac, R. J. Adams, S. a Morris, A. Danckaert, J.-F. Le Garrec, and M. Zernicka-Goetz, "Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst.," *Developmental biology*, vol. 331, no. 2, pp. 210–21, Jul. 2009.
- [92] M. Tangney and K. P. Francis, "In vivo optical imaging in gene & cell therapy.," *Current gene therapy*, vol. 12, no. 1, pp. 2–11, Feb. 2012.
- [93] S. Singh, V. Bhattacharjee, P. Mukhopadhyay, C. a Worth, S. R. Wellhausen, C. P. Warner, R. M. Greene, and M. M. Pisano, "Fluorescence-activated cell sorting of EGFP-labeled neural crest cells from murine embryonic craniofacial tissue.," *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2005, no. 3, pp. 232–7, Jan. 2005.
- [94] C. Schorl and J. M. Sedivy, "Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells.," *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 41, no. 2, pp. 143–50, Feb. 2007.
- [95] J. M. Hum, A. P. Siegel, F. M. Pavalko, and R. N. Day, "Monitoring biosensor activity in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy.," *International journal of molecular sciences*, vol. 13, no. 11, pp. 14385–400, Jan. 2012.
- [96] T. I. Klock, P. Kurys, C. Elbi, A. K. Nagaich, A. Hendarwanto, T. Slagsvold, C.-Y. Chang, G. L. Hager, and F. Saatcioglu, "Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells.," *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 5, pp. 1823–43, Mar. 2007.
- [97] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P. M. W. French, S. L  v  que-Fort, S. E. D. Webb, and D. M. Davis, "Imaging the environment of green fluorescent protein.," *Biophysical journal*, vol. 83, no. 6, pp. 3589–95, Dec. 2002.
- [98] D. Mazza, A. Abernathy, N. Golob, T. Morisaki, and J. G. McNally, "A benchmark for chromatin binding measurements in live cells.," *Nucleic acids research*, vol. 40, no. 15, p. e119, Aug. 2012.
- [99] B. D. Engel, W. B. Ludington, and W. F. Marshall, "Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model.," *The Journal of cell biology*, vol. 187, no. 1, pp. 81–9, Oct. 2009.

- [100] S. Daddi Oubekka, R. Briandet, M.-P. Fontaine-Aupart, and K. Steenkeste, "Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 56, no. 6, pp. 3349–58, Jul. 2012.
- [101] E. Krieghoff, J. Behrens, and B. Mayr, "Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention.," *Journal of cell science*, vol. 119, no. Pt 7, pp. 1453–63, May 2006.
- [102] R. Métivier, G. Reid, and F. Gannon, "Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression.," *EMBO reports*, vol. 7, no. 2, pp. 161–7, Mar. 2006.
- [103] D. Wüstner, L. M. Solanko, F. W. Lund, D. Sage, H. J. Schroll, and M. a Lomholt, "Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation.," *BMC bioinformatics*, vol. 13, p. 296, Jan. 2012.
- [104] R. Weigert, N. Porat-Shliom, and P. Amornphimoltham, "Imaging cell biology in live animals: ready for prime time.," *The Journal of cell biology*, vol. 201, no. 7, pp. 969–79, Jun. 2013.
- [105] V. Korinek, N. Barker, P. Morin, and D. van Wichen, "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/-colon carcinoma," *Science*, 1997.
- [106] D. Barnett, R. Louzao, P. Gambell, J. De, T. Oldaker, and C. a Hanson, "Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part IV - postanalytic considerations.," *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, vol. 84, no. 5, pp. 309–14, 2013.
- [107] C. M. Hedgepeth, L. J. Conrad, J. Zhang, H. C. Huang, V. M. Lee, and P. S. Klein, "Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action.," *Developmental biology*, vol. 185, no. 1, pp. 82–91, May 1997.
- [108] J. R. Miller, a M. Hocking, J. D. Brown, and R. T. Moon, "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways.," *Oncogene*, vol. 18, no. 55, pp. 7860–72, Dec. 1999.
- [109] A. P. McMahon and R. T. Moon, "Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in Xenopus embryos leads to duplication of the embryonic axis," *Cell*, vol. 58, no. 6, pp. 1075–1084, 1989.
- [110] T. T. Ni, E. J. Rellinger, A. Mukherjee, S. Xie, L. Stephens, C. a Thorne, K. Kim, J. Hu, E. Lee, L. Marnett, A. K. Hatzopoulos, and T. P. Zhong, "Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling.," *Chemistry & biology*, vol. 18, no. 12, pp. 1658–68, Dec. 2011.
- [111] N. Currier, K. Chea, M. Hlavacova, D. J. Sussman, D. C. Seldin, and I. Dominguez, "Dynamic expression of a LEF-EGFP Wnt reporter in mouse development and cancer.," *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, vol. 48, no. 3, pp. 183–94, Mar. 2010.
- [112] K. M. Borchert, R. J. S. Galvin, C. A. Frolik, L. V Hale, D. L. Halladay, R. J. Gonyier, O. J. Trask, D. R. Nickischer, and K. A. Houck, "High-content screening assay for activators of the Wnt/Fzd

- pathway in primary human cells.," *Assay and drug development technologies*, vol. 3, no. 2, pp. 133–141, 2005.
- [113] K. Carmon and D. Loose, "Wnt7a interaction with Fzd5 and detection of signaling activation using a split eGFP," *Biochemical and biophysical research ...*, vol. 368, no. 2, pp. 285–291, 2008.
- [114] S. Naik, R. S. Dothager, J. Marasa, C. L. Lewis, and D. Piwnica-Worms, "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer.," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 15, no. 24, pp. 7529–7537, Dec. 2009.
- [115] Q. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, N. D. Camp, N. Nishiya, E. C. Peters, M. H. Ginsberg, X. Jian, P. a Randazzo, P. G. Schultz, R. T. Moon, and S. Ding, "Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 18, pp. 7444–8, May 2007.
- [116] K. Ewan, B. Paj\kak, M. Stubbs, H. Todd, O. Barbeau, C. Quevedo, H. Botfield, R. Young, R. Ruddle, L. Samuel, and others, "A Useful Approach to Identify Novel Small-Molecule Inhibitors of Wnt-Dependent Transcription," *Cancer research*, vol. 70, no. 14, p. 5963, 2010.
- [117] S. Park, J. Gwak, M. Cho, T. Song, J. Won, D.-E. Kim, J.-G. Shin, and S. Oh, "Hexachlorophene inhibits Wnt/beta-catenin pathway by promoting Siah-mediated beta-catenin degradation.," *Molecular pharmacology*, vol. 70, no. 3. pp. 960–6, Sep-2006.
- [118] J. Liu, A. Bang, and C. Kintner, "Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis," *Proceedings of the*, vol. 102, no. 6, pp. 1927–1932, 2005.
- [119] J. Vadolas, H. Wardan, and M. Orford, "Cellular genomic reporter assays for screening and evaluation of inducers of fetal hemoglobin," *Human molecular*, vol. 13, no. 2, pp. 223–233, 2004.
- [120] R. Anton, S. S. Chatterjee, J. Simundza, P. Cowin, and R. DasGupta, "A Systematic Screen for Micro-RNAs Regulating the Canonical Wnt Pathway," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, p. e26257, Oct. 2011.
- [121] C. Fuerer and R. Nusse, "Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway.," *PloS one*, vol. 5, no. 2, p. e9370, Jan. 2010.
- [122] D. Horst, J. Chen, T. Morikawa, S. Ogino, T. Kirchner, and R. a Shivdasani, "Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling.," *Cancer research*, vol. 72, no. 6, pp. 1547–56, Mar. 2012.
- [123] B. E. Jacques, C. Puligilla, R. M. Weichert, A. Ferrer-Vaquer, A.-K. Hadjantonakis, M. W. Kelley, and A. Dabdoub, "A dual function for canonical Wnt/ -catenin signaling in the developing mammalian cochlea," *Development*, vol. 140, no. 1, pp. 247–247, Dec. 2012.

- [124] a S. Rao, N. Kremenevskaja, J. Resch, and G. Brabant, "Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling.," *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, vol. 153, no. 6, pp. 929–38, Dec. 2005.
- [125] M. van Noort, J. Meeldijk, R. van der Zee, O. Destree, and H. Clevers, "Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 20, pp. 17901–5, May 2002.
- [126] A. C. Rios, N. Denans, and C. Marcelle, "Real-time observation of Wnt beta-catenin signaling in the chick embryo.," *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, vol. 239, no. 1, pp. 346–53, Jan. 2010.
- [127] B.-E. Shan, M.-X. Wang, and R. Li, "Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway.," *Cancer investigation*, vol. 27, no. 6, pp. 604–12, Jul. 2009.
- [128] M. Shtutman, J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev, "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, no. 10, pp. 5522–5527, 1999.
- [129] J. Zhang, G. J. Woodhead, S. K. Swaminathan, S. R. Noles, E. R. McQuinn, A. J. Pisarek, A. M. Stocker, C. a Mutch, N. Funatsu, and A. Chenn, "Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling.," *Developmental cell*, vol. 18, no. 3, pp. 472–9, Mar. 2010.
- [130] Y.-J. Kang, H. J. Park, H.-J. Chung, H.-Y. Min, E. J. Park, M. A. Lee, Y. Shin, and S. K. Lee, "Wnt/ $\beta$ -catenin signaling mediates the antitumor activity of magnolol in colorectal cancer cells.," *Molecular pharmacology*, vol. 82, no. 2, pp. 168–77, Aug. 2012.
- [131] S. Nyati, R. Ranga, B. D. Ross, A. Rehemtulla, and M. S. Bhojani, "Molecular imaging of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and casein kinase-1 $\alpha$  kinases.," *Analytical biochemistry*, vol. 405, no. 2, pp. 246–54, Oct. 2010.
- [132] S.-H. Lee, R. L. Richardson, R. H. Dashwood, and S. J. Baek, "Capsaicin represses transcriptional activity of  $\beta$ -catenin in human colorectal cancer cells.," *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 23, no. 6, pp. 646–55, Jun. 2012.
- [133] S. Naik and D. Piwnica-Worms, "Real-time imaging of beta-catenin dynamics in cells and living mice.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 44, pp. 17465–70, Oct. 2007.
- [134] T. Holzer, K. Liffers, K. Rahm, B. Trageser, S. Ozbek, and D. Gradl, "Live imaging of active fluorophore labelled Wnt proteins.," *FEBS letters*, vol. 586, no. 11, pp. 1638–44, Jul. 2012.
- [135] M. S. Raab, I. Breikreutz, G. Tonon, J. Zhang, P. J. Hayden, T. Nguyen, J. H. Fruehauf, B. K. Lin, D. Chauhan, T. Hideshima, N. C. Munshi, K. C. Anderson, and K. Podar, "Targeting PKC: a novel

- role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling.," *Blood*, vol. 113, no. 7, pp. 1513–21, Feb. 2009.
- [136] X. Liu, L. Wang, S. Zhao, X. Ji, Y. Luo, and F. Ling, "β-Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells.," *Medical oncology (Northwood, London, England)*, vol. 28, no. 2, pp. 608–14, Jun-2011.
- [137] K. KIM and E. D. HAY, "NEW EVIDENCE THAT NUCLEAR IMPORT OF ENDOGENOUS beta-CATENIN IS LEF-1 DEPENDENT, WHILE LEF-1 INDEPENDENT IMPORT OF EXOGENOUS beta-CATENIN LEADS TO NUCLEAR ABNORMALITIES," Nov. 2001.
- [138] A. Damalas, A. Ben-Ze'ev, I. Simcha, M. Shtutman, J. F. Leal, J. Zhurinsky, B. Geiger, and M. Oren, "Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53.," *The EMBO journal*, vol. 18, no. 11, pp. 3054–63, Jun. 1999.
- [139] M. F. McEntee, C.-H. Chiu, and J. Whelan, "Relationship of -catenin and Bcl-2 expression to sulindac-induced regression of intestinal tumors in Min mice," *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 4, pp. 635–640, Apr. 1999.
- [140] A. Giannini and M. Vivanco, "Analysis of b-Catenin Aggregation and Localization Using GFP Fusion Proteins: Nuclear Import of a-Catenin by the b-Catenin/Tcf Complex," *Experimental Cell*, vol. 220, pp. 207–220, 2000.
- [141] K. Orford, C. C. Orford, and S. W. Byers, "Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest.," *The Journal of cell biology*, vol. 146, no. 4, pp. 855–68, Aug. 1999.
- [142] P. Liu, J. Yang, J. Pei, D. Pei, and M. J. Wilson, "Regulation of MT1-MMP activity by β-catenin in MDCK non-cancer and HT1080 cancer cells.," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 225, no. 3, pp. 810–821, 2010.
- [143] S. Götze, "Epigenetische Regulation im Wnt Signalweg," Ruhr-Universität Bochum, 2010.
- [144] W. J. Nelson and R. Nusse, "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1483–7, Mar. 2004.
- [145] X. Tian, Z. Liu, B. Niu, J. Zhang, T. K. Tan, S. R. Lee, Y. Zhao, D. C. H. Harris, and G. Zheng, "E-Cadherin/β-Catenin Complex and the Epithelial Barrier.," *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2011, p. 567305, Jan-2011.
- [146] S. Dihlmann, S. Klein, and M. V. K. Doeberitz Mv, "Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin.," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 2, no. 6, pp. 509–516, 2003.

- [147] J. Hardwick, S. Diks, M. Van Santen, L. Tertoolen, S. Van Deventer, M. Peppelenbosch, and S. Submitted, "Aspirin and d Indomethacin act directly on the Wnt/beta-catenin pathway," pp. 59–74.
- [148] W. Lu, H. N. Tinsley, A. Keeton, Z. Qu, G. a Piazza, and Y. Li, "Suppression of Wnt/beta-catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation.," *European journal of pharmacology*, vol. 602, no. 1. pp. 8–14, Jan-2009.
- [149] H. Oshima, M. Oshima, M. Kobayashi, M. Tsutsumi, and M. M. Taketo, "Morphological and molecular processes of polyp formation in Apc(delta716) knockout mice.," *Cancer research*, vol. 57, no. 9, pp. 1644–9, May 1997.
- [150] G. Steinbach, P. M. Lynch, R. K. Phillips, M. H. Wallace, E. Hawk, G. B. Gordon, N. Wakabayashi, B. Saunders, Y. Shen, T. Fujimura, L. K. Su, B. Levin, L. Godio, S. Patterson, M. A. Rodriguez-Bigas, S. L. Jester, K. L. King, M. Schumacher, J. Abbruzzese, R. N. DuBois, W. N. Hittelman, S. Zimmerman, J. W. Sherman, and G. Kelloff, "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.," *The New England journal of medicine*, vol. 342, no. 26, pp. 1946–52, Jun. 2000.
- [151] Y. Qin, L. Li, W. Pan, and D. Wu, "Regulation of phosphatidylinositol kinases and metabolism by Wnt3a and Dvl.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 34, pp. 22544–8, Aug. 2009.
- [152] Y. Yoshinaga, T. Kagawa, T. Shimizu, T. Inoue, S. Takada, J. Kuratsu, and T. Taga, "Wnt3a promotes hippocampal neurogenesis by shortening cell cycle duration of neural progenitor cells.," *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 30, no. 7, pp. 1049–58, Oct. 2010.
- [153] O. Varea, J. J. Garrido, A. Dopazo, P. Mendez, L. M. Garcia-Segura, and F. Wandosell, "Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons.," *PloS one*, vol. 4, no. 4. p. e5153, Jan-2009.
- [154] H. Choi, J. Gwak, M. Cho, M.-J. Ryu, J.-H. Lee, S. K. Kim, Y. H. Kim, G. W. Lee, M.-Y. Yun, N. M. Cuong, J.-G. Shin, G.-Y. Song, and S. Oh, "Murrayafoline A attenuates the Wnt/beta-catenin pathway by promoting the degradation of intracellular beta-catenin proteins.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 391, no. 1, pp. 915–20, Jan. 2010.
- [155] S. Sievers, C. Fritsch, M. Grzegorzcyk, C. Kuhnen, and O. Müller, "Absolute beta-catenin concentrations in Wnt pathway-stimulated and non-stimulated cells.," *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, vol. 11, no. 3, pp. 270–8, 2006.
- [156] A. K. Silva, H. Yi, S. H. Hayes, G. M. Seigel, and A. S. Hackam, "Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway.," *Molecular vision*, vol. 16, no. August 2009, pp. 36–45, Jan. 2010.

- [157] A. Hiyama, D. Sakai, F. Arai, D. Nakajima, K. Yokoyama, and J. Mochida, "Effects of a glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitor (LiCl) on c-myc protein in intervertebral disc cells.," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 112, no. 10, pp. 2974–86, Oct-2011.
- [158] D. W. Kang and D. S. Min, "Positive feedback regulation between phospholipase D and Wnt signaling promotes Wnt-driven anchorage-independent growth of colorectal cancer cells.," *PloS one*, vol. 5, no. 8, p. e12109, Jan. 2010.
- [159] L. Deng, S. Hu, a R. Baydoun, J. Chen, X. Chen, and X. Cong, "Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway.," *Cell proliferation*, vol. 42, no. 6, pp. 721–30, Dec. 2009.
- [160] C. Bianco, R. Patrick, and V. Nussenzweig, "A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 132, no. 4, pp. 702–20, Oct. 1970.
- [161] L. A. Herzenberg and R. G. Sweet, "Fluorescence-activated cell sorting.," *Scientific American*, vol. 234, no. 3, pp. 108–17, Mar. 1976.
- [162] M. E. Kamarck, "Fluorescence-activated cell sorting of hybrid and transfected cells.," *Methods in enzymology*, vol. 151, pp. 150–65, Jan. 1987.
- [163] J. Liu, R. Bombera, L. Leroy, Y. Roupioz, D. R. Baganizi, P. N. Marche, V. Haguët, P. Mailley, and T. Livache, "Selective individual primary Cell capture Using locally bio-Functionalized Micropores," *PloS one*, vol. 8, no. 3, p. e57717, Jan. 2013.
- [164] J.-C. Wu, P.-Y. Tseng, W.-S. Tsai, M.-Y. Liao, S.-H. Lu, C. W. Frank, J.-S. Chen, H.-C. Wu, and Y.-C. Chang, "Antibody conjugated supported lipid bilayer for capturing and purification of viable tumor cells in blood for subsequent cell culture.," *Biomaterials*, vol. 34, no. 21, pp. 5191–9, Jul. 2013.
- [165] T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, and Y. Sakurai, "Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces.," *Biomaterials*, vol. 16, no. 4, pp. 297–303, Mar. 1995.
- [166] E. Mandrusov, A. Houg, E. Klein, and E. F. Leonard, "Membrane-based cell affinity chromatography to retrieve viable cells.," *Biotechnology progress*, vol. 11, no. 2, pp. 208–13.
- [167] J. D. Uram, K. Ke, A. J. Hunt, and M. Mayer, "Label-free affinity assays by rapid detection of immune complexes in submicrometer pores.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 45, no. 14, pp. 2281–5, Mar. 2006.
- [168] T. W. Chang, "Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface.," *Journal of immunological methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 217–23, Dec. 1983.
- [169] J. D. Brewster, "Isolation and concentration of Salmonellae with an immunoaffinity column.," *Journal of microbiological methods*, vol. 55, no. 1, pp. 287–93, Oct. 2003.

- [170] P. Li, Y. Gao, and D. Pappas, "Multiparameter cell affinity chromatography: separation and analysis in a single microfluidic channel.," *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 19, pp. 8140–8, Oct. 2012.
- [171] A. Rembaum and W. J. Dreyer, "Immunomicrospheres: reagents for cell labeling and separation.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 208, no. 4442, pp. 364–8, Apr. 1980.
- [172] S. Nagrath, L. V Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber, and M. Toner, "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.," *Nature*, vol. 450, no. 7173, pp. 1235–9, Dec. 2007.
- [173] B. D. Plouffe, T. Kniazeva, J. E. Mayer, S. K. Murthy, and V. L. Sales, "Development of microfluidics as endothelial progenitor cell capture technology for cardiovascular tissue engineering and diagnostic medicine.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 23, no. 10, pp. 3309–14, Oct. 2009.
- [174] A. Sin, S. K. Murthy, A. Revzin, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Enrichment using antibody-coated microfluidic chambers in shear flow: model mixtures of human lymphocytes.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 91, no. 7, pp. 816–26, Sep. 2005.
- [175] Y. Roupioz, N. Berthet-Duroure, T. Leïchl , J.-B. Pourciel, P. Mailley, S. Cortes, M.-B. Villiers, P. N. Marche, T. Livache, and L. Nicu, "Individual blood-cell capture and 2D organization on microarrays.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 5, no. 13, pp. 1493–7, Jul. 2009.
- [176] U. Dharmasiri, S. K. Njoroge, M. A. Witek, M. G. Adebisi, J. W. Kamande, M. L. Hupert, F. Barany, and S. A. Soper, "High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system.," *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 6, pp. 2301–9, Mar. 2011.
- [177] E. D. Pratt, C. Huang, B. G. Hawkins, J. P. Gleghorn, and B. J. Kirby, "Rare Cell Capture in Microfluidic Devices.," *Chemical engineering science*, vol. 66, no. 7, pp. 1508–1522, Apr. 2011.
- [178] S. M. Bezrukov, "Ion channels as molecular coulter counters to probe metabolite transport.," *The Journal of membrane biology*, vol. 174, no. 1, pp. 1–13, Mar. 2000.
- [179] W. Chen, S. Weng, F. Zhang, S. Allen, X. Li, L. Bao, R. H. W. Lam, J. a Macoska, S. D. Merajver, and J. Fu, "Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies.," *ACS nano*, vol. 7, no. 1, pp. 566–75, Jan. 2013.
- [180] M. Bitoec, "MACS Technology portfolio for all your cell isolation needs," 2013. [Online]. Available: <https://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology.aspx>.
- [181] J. D. Chesnut, A. R. Baytan, M. Russell, M. P. Chang, A. Bernard, I. H. Maxwell, and J. P. Hoefler, "Selective isolation of transiently transfected cells from a mammalian cell population

- with vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody.," *Journal of immunological methods*, vol. 193, no. 1, pp. 17–27, Jun. 1996.
- [182] C. Jamieson, M. Sharma, and B. R. Henderson, "Wnt signaling from membrane to nucleus:  $\beta$ -Catenin caught in a loop.," *The international journal of biochemistry cell biology*, vol. 44, no. 6, pp. 847–50, 2012.
- [183] H. Y. Kim and L. a Davidson, "Punctuated actin contractions during convergent extension and their permissive regulation by the non-canonical Wnt-signaling pathway.," *Journal of cell science*, vol. 124, no. Pt 4, pp. 635–46, Feb. 2011.
- [184] S. Huang, Y. Mishina, and S. Liu, "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling," *Nature*, vol. 461, no. 7264, pp. 614–620, 2009.
- [185] X. Bao, H. Song, Z. Chen, and X. Tang, "Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells.," *Molecular vision*, vol. 18, no. July, pp. 1983–90, Jan. 2012.
- [186] J. Heuberger and W. Birchmeier, "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling," *Cold Spring Harbor*, pp. 1–24, 2010.
- [187] G. Barrière, M. Tartary, and M. Rigaud, "Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells.," *ISRN oncology*, vol. 2012, p. 382010, Jan. 2012.
- [188] U. H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Löchner, and W. Birchmeier, "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.," *The Journal of cell biology*, vol. 113, no. 1, pp. 173–85, Apr. 1991.
- [189] D. B. Stewart, a I. Barth, and W. J. Nelson, "Differential regulation of endogenous cadherin expression in Madin-Darby canine kidney cells by cell-cell adhesion and activation of beta -catenin signaling.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 27. pp. 20707–16, 07-Jul-2000.
- [190] L. Taneyhill and D. Pennica, "Identification of Wnt responsive genes using a murine mammary epithelial cell line model system," *BMC Developmental Biology*, vol. 4, p. 6, 2004.
- [191] Y. Ueda, M. Hijikata, S. Takagi, R. Takada, S. Takada, T. Chiba, and K. Shimotohno, "Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 99, no. 5, pp. 681–8, Jun. 2002.
- [192] M. Elbert and D. Cohen, "PAR1b promotes cell-cell adhesion and inhibits dishevelled-mediated transformation of Madin-Darby canine kidney cells," *Molecular biology of the cell*, vol. 17, no. August, pp. 3345–3355, 2006.
- [193] C. Gerding-Reimers, "Identifikation Mitose- und Zytoskelett-modulierender Substanzen mittels vorwärts gerichteter Chemischer Genetik," 2011.

- [194] I.-M. Karaguni, P. Herter, P. Debruyne, S. Chtarbova, A. Kasprzyński, U. Herbrand, M.-R. Ahmadian, K.-H. Glüsenkamp, G. Winde, M. Mareel, T. Möröy, and O. Müller, "The new sulindac derivative IND 12 reverses Ras-induced cell transformation.," *Cancer research*, vol. 62, no. 6, pp. 1718–23, Mar. 2002.
- [195] D. Guardavaccaro and H. Clevers, "Wnt/ $\beta$ -catenin and MAPK signaling: allies and enemies in different battlefields.," *Science signaling*, vol. 5, no. 219. p. pe15, 10-Apr-2012.
- [196] E. Zeller, K. Mock, M. Horn, S. Colnot, M. Schwarz, and A. Braeuning, "Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and candidate mediators of  $\beta$ -catenin/Ras signaling interactions.," *Biological chemistry*, vol. 393, no. 10. pp. 1183–91, Oct-2012.
- [197] J. Cáslavský, Z. Klímová, and T. Vomastek, "ERK and RSK regulate distinct steps of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype.," *Cellular signalling*, vol. 25, no. 12, pp. 2743–51, Dec. 2013.
- [198] H. Schramek, E. Feifel, I. Marschitz, N. Golochtchapova, G. Gstraunthaler, and R. Montesano, "Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells.," *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 285, no. 3, pp. C652–61, Sep. 2003.