



„Molekulare Charakterisierung des Stammzellmarkers *LGR5* und der  
Spleißvariante *LGR5Δ5* in humanen Tumoren“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
- Biowissenschaften -  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Swetlana Rot  
geb. am 27.01.1980 in Moskau

- Gutachter:
1. PD Dr. rer. nat. Hauke Lilie
  2. Prof. Dr. med. Dirk Vordermark
  3. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

Datum der Abgabe: 11.05.2016

Datum der Verteidigung: 4.04.2017

*In Büchern über naturwissenschaftliche Forschung ist viel die Rede von Faszination, Erkenntnisdurst und Begeisterung.*

*Wenig liest man dagegen vom endlosen Pipetieren, verunglückten Experimenten, kleinlichen BAT-Verträgen oder schäbigen Stipendien.*

*Jahrelange Arbeit führt häufig nur zu der Entdeckung, dass es in der eingeschlagenen Richtung nichts zu entdecken gibt. Zum Erfolg an der Laborbank gehören eben Glück, Fleiß, Einfallsreichtum, gute Betreuung und Intelligenz – in dieser Reihenfolge. [...]*

*Lassen Sie sich also nicht entmutigen! Auch die anderen rackern sich erfolglos ab; es ist normal, dass sich erstmal kein Ergebnis blicken lässt. Halten Sie durch! – Oder lernen Sie gleich einen vernünftigen Beruf.*

Hubert Rehm

[Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics]

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Charakterisierung von Tumorerkrankungen .....	1
1.2	Das Tumorstammzellmodell und klonale Selektion .....	2
1.3	Metastasierung und Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) .....	5
1.4	Wnt Signaltransduktionsweg.....	7
1.5	LGR5 .....	11
1.5.1	Klassifikation und struktureller Aufbau .....	11
1.5.2	Funktion .....	13
1.5.3	Wirkmechanismus .....	14
1.5.4	Klinische Bedeutung .....	17
1.6	Zielstellung.....	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Zelllinien und Patientengut.....	20
2.1.2	Oligonukleotide .....	20
2.1.3	Bakterien.....	21
2.1.4	Plasmide.....	21
2.1.5	shRNA-Plasmide.....	21
2.1.6	Antikörper.....	22
2.1.7	Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.8	Enzyme und Größenstandards .....	23
2.1.9	Kit Systeme .....	23
2.1.10	Geräte und Verbrauchsmittel.....	24
2.2	Methoden .....	24
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	24
2.2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	24
2.2.1.2	Lentivirale Transduktion .....	25
2.2.1.3	Internalisierungsassay ( <i>pulse chase</i> ).....	26
2.2.1.4	Behandlung der Zellen mit Agonisten des Wnt Signalweges .....	26
2.2.1.5	Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren der Endozytose.....	27
2.2.1.6	Zellkoloniebildungstest.....	27
2.2.1.7	Wundheilungsassay ( <i>scratch assay</i> ) .....	28
2.2.1.8	Bestimmung des Zellwachstums mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay.....	28
2.2.1.9	TOPFlash-Assay .....	28
2.2.2	Molekular- und mikrobiologische Methoden.....	31

2.2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden .....	31
2.2.2.2	Mikrobiologische Standardmethoden .....	31
2.2.2.3	Isolation der Gesamt-RNA mittels TRIZOL .....	31
2.2.2.4	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (RT) .....	32
2.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.2.5.1	Polymerase -Kettenreaktion mittels der <i>taq</i> -Polymerase .....	32
2.2.2.5.2	<i>high-fidelity</i> Polymerase-Kettenreaktion .....	33
2.2.2.6	Quantitative Echtzeit-PCR .....	33
2.2.2.7	Konstruktion LGR5 und LGR5 $\Delta$ 5 überexprimierender Vektoren .....	35
2.2.2.8	DNA-Mikroarray-Analysen .....	36
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	36
2.2.3.1	Proteinisolierung aus Zellkulturen und Konzentrationsbestimmung .....	36
2.2.3.2	Western Blot-Analyse .....	36
2.2.3.2.1	SDS-PAGE .....	36
2.2.3.2.2	Transfer .....	37
2.2.3.2.3	Immundetektion .....	37
2.2.3.3	Immunfluoreszenz auf Deckgläschen .....	38
2.2.3.4	Immunhistologische Untersuchung der Sphäroide .....	38
2.2.4	Statistische Analysen .....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1	<i>LGR5</i> -mRNA-Gehalt in verschiedenen Zelllinien .....	40
3.2	Untersuchung der Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges in unterschiedlichen Zelllinien .....	41
3.3	Identifizierung der LGR5 $\Delta$ 5 Spleißvariante .....	42
3.4	Etablierung von Zelllinien mit stabil veränderter <i>LGR5</i> -Expression .....	43
3.5	Nachweis einer veränderten <i>LGR5</i> Expression auf RNA- und Proteinniveau .....	44
3.6	Lokalisation des überexprimierten LGR5FL- und LGR5 $\Delta$ 5-Proteins in der Zelle .....	46
3.7	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges .....	47
3.8	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf das klonogene Zellüberleben .....	50
3.9	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf das zelluläre Wachstum im SRB-Assay ...	52
3.10	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf die Migration im Wundheilungsassay ...	54
3.11	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf das 3D-Wachstum (Sphäroidbildung) ...	56
3.12	Microarray Analysen .....	60
3.13	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf den mRNA-Gehalt ausgewählter EMT- und Stammzellmarker .....	61
3.14	Gehalt ausgewählter Proteine nach Modulation der <i>LGR5</i> -Expression .....	64

---

3.15	Die Internalisierung von LGR5FL und LGR5Δ5 .....	65
3.15.1	Internalisierung in Abhängigkeit von der Zeit und der Art der Stimulation .....	65
3.15.2	Inhibierung der Endozytosewege .....	66
3.15.3	Untersuchung des Endozytosewegs von LGR5FL und LGR5Δ5 .....	67
3.16	Prognostische und klinische Bedeutung von LGR5FL und dessen Spleißvariante LGR5Δ5 .	70
3.16.1	Klinische und prognostische Bedeutung des LGR5FL und LGR5Δ5 in Weichteilsarkomen .	70
3.16.2	Klinische und prognostische Bedeutung des LGR5FL und LGR5Δ5 in oralen Plattenepithelkarzinomen .....	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>76</b>
4.1	<i>LGR5</i> -mRNA-Gehalt verschiedener Zelllinien .....	76
4.2	Identifizierung der LGR5 delta 5 Spleißvariante .....	77
4.3	Modulation der <i>LGR5</i> -Expression in Tumorzelllinien .....	80
4.4	Einfluss einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt- Signaltransduktionsweges .....	80
4.5	Auswirkungen einer veränderten <i>LGR5</i> -Expression auf das zellbiologische Verhalten von Tumorzelllinien .....	84
4.6	Prognostische und klinische Bedeutung von LGR5FL und dessen Spleißvariante LGR5Δ5 .	88
4.7	Einfluss der Modulation der <i>LGR5</i> Expression auf den mRNA-Gehalt ausgewählter EMT- und Stammzellmarker .....	90
4.8	Endozytose und Inhibierung der Endozytose .....	95
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
6.1	Publikationen .....	102
6.2	Internetquellen .....	112
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>113</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	113
7.2	Oligonukleotide .....	115
7.3	TopFlash .....	118
7.4	Sphäroide .....	122
7.5	mRNA-Gehalt ausgewählter Gene nach Modulation der <i>LGR5</i> Expression .....	125
7.6	Überleben und Klinische Daten .....	132
7.7	LGR5 Endozytose .....	136
7.8	Endogene Expression Wnt-Signalweg relevanten Gene in Tumorzelllinien .....	138
7.9	Ergebnisse der Microarray Untersuchungen .....	139

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeine Charakterisierung von Tumorerkrankungen

Krebserkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Im Jahr 2011 sind nach der Schätzung des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) in Deutschland insgesamt 483.577 Krebsneuerkrankungen diagnostiziert worden (Männer: 255 318; Frauen: 228 259). Dabei betrifft etwas mehr als die Hälfte der Fälle entweder die Brustdrüse (70.000), die Prostata (64.500), den Darm (63.000) oder die Lunge (52.700). Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose liegt bei 69 Jahren. Etwa 51 % aller Männer und 43 % aller Frauen müssen damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an Krebs zu erkranken. Darüber hinaus verstirbt jeder vierte Mann und jede fünfte Frau in Folge einer Krebserkrankung. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten unterscheiden sich sehr stark in Abhängigkeit von der Tumorart. Die Überlebensraten reichen von über 90 % für das maligne Melanom der Haut, den Hodenkrebs und den Prostatakrebs bis hin zu Überlebensraten von weniger als 10 % bei bösartigen Tumoren der Bauchspeicheldrüse oder dem Mesotheliom (ZfKD). Verschiedene Gewebe des menschlichen Körpers unterliegen einer ständigen Erneuerung, wobei ein streng kontrolliertes Fließgleichgewicht zwischen Zellwachstum, Differenzierung und programmiertem Zelltod durch Apoptose die wichtigste Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit eines Gewebes darstellt. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zu einer unkontrollierten Zellproliferation und damit zur Ausbildung von Neoplasien (Neubildungen des Gewebes), den Tumoren, führen (Bertram 2000). Im Verlauf der Tumorentstehung (Karzinogenese) häuft eine Zelle eine Vielzahl von Mutationen in ihrem Genom an, wodurch sie eine Reihe neuer Eigenschaften wie die Fähigkeit zur eigengesteuerten Angiogenese, Invasion und Metastasierung sowie Apoptoseresistenz und Selbsterneuerungspotenzial erwirbt (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011). Bei solchen Mutationen handelt es sich oft um *loss of function*- (Funktionsverlust) oder *gain of function*-Mutationen (verstärkte Genaktivität) in Protoonkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen. Diese können bereits in der Keimbahn vorliegen (vererbte Mutationen), treten jedoch meist spontan durch Fehler bei der DNA-Replikation bzw. -Reparatur oder durch den Einfluss von Umweltfaktoren wie kurzweiliger elektromagnetischer Strahlung, chemischer Substanzen oder humanpathogener Viren auf (Hanahan und Weinberg 2000; Bertram 2000). Die Transformation einer normalen Körperzelle zu einer Tumorzelle ist ein Prozess, bei dem Mutationen in einer Zelle stufenweise angehäuft werden und der sich über Jahrzehnte hinziehen kann. Zunächst bekommt eine kleine Zellpopulation (Präkanzerose) einen Wachstumsvorteil gegenüber dem umliegenden Normalgewebe. In weiteren Selektionsereignissen bekommen die Zellen einen Überlebensvorteil, welche unter den gegebenen Bedingungen effizienter wachsen können (Vineis und Berwick 2006). Dabei können sich benigne (gutartige) Tumore ausbilden, welche nur lokal wirken und somit lediglich das angrenzende Gewebe verdrängen bzw. zerstören oder maligne (bösartige) Tumore, die unkontrolliert wachsen und invasiv das umliegende Gewebe infiltrieren. Letztere zeichnen sich zudem durch die Fähigkeit aus, sich über

tumorassoziierte Blut- oder Lymphgefäße in anderen Geweben des Körpers anzusiedeln und dort Tochtergeschwüre (Metastasen) zu bilden (Bertram 2000). Tumore, welche von den Epithelien ausgehen, werden als Karzinome bezeichnet und machen den weitaus größten Teil aller Krebserkrankungen aus. Karzinome werden weiter unterteilt in Plattenepithelkarzinome, die sich von der Hornhaut ableiten, und squamöse Karzinome, die sich von den Schleimhäuten ableiten. Karzinome, die sich vom Drüsenepithel ableiten, werden als Adenokarzinome bezeichnet. Tumore aus dem mesenchymalen Gewebe werden als Sarkome und embryonale Tumore als Blastome bezeichnet (Riede 1998). Die Therapie der meisten Tumorerkrankungen umfasst eine möglichst vollständige operative Entfernung des Tumors in Kombination mit einer Chemo- und/oder Strahlentherapie. Derzeit nehmen in der Tumorthherapie zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) immer mehr an Bedeutung zu, welche mit der konventionellen Radio- oder Chemotherapie kombiniert werden. Dabei handelt es sich um Biologika, z. B. Antikörper, die gegen bestimmte Proteine, Wachstumsfaktoren oder Membranrezeptoren gerichtet sind (Argiris *et al.* 2008; Al-Sarraf 2002; Argiris *et al.* 2008; Wu *et al.* 2013). Auf diese Weise erzielt man eine selektive Hemmung von Signalwegen, welche die Tumorprogression antreiben. Während frühzeitig erkannte Tumore, welche noch keine Metastasen ausgebildet haben, gut behandelt werden können, sinken die Heilungschancen von Patienten mit metastasierender Tumore stark.

## 1.2 Das Tumorstammzellmodell und klonale Selektion

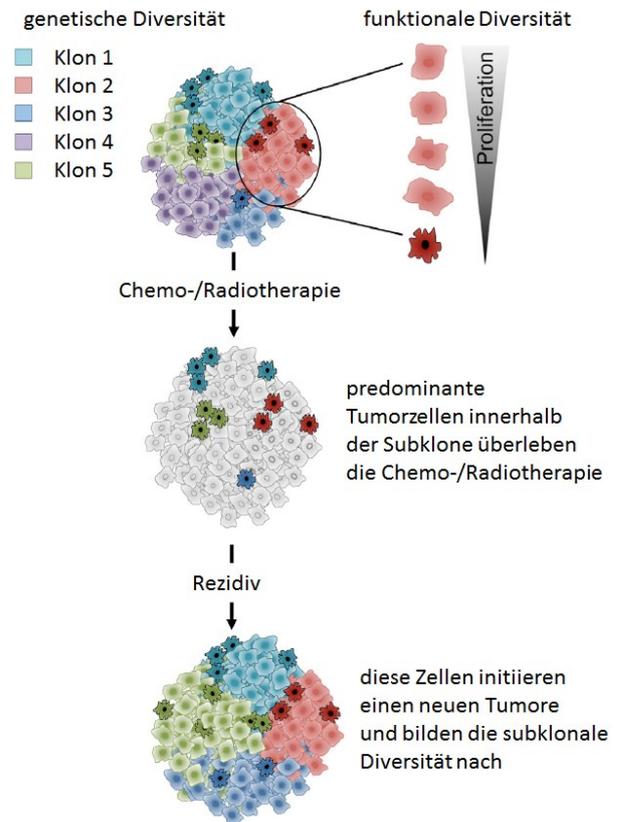
Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts wurde festgestellt, dass sich Tumore analog zum normalen Gewebe aus phänotypisch und funktional heterogenen Zellpopulationen zusammensetzen (Dick 2008). Diese Heterogenität unter den Zellpopulationen eines Tumors kann auf verschiedenen Wegen entstehen. Das Modell der klonalen Evolution (stochastisches Modell) beschreibt einen Entstehungsmechanismus, bei dem intrinsische Unterschiede zwischen den Tumorzellen eines Tumors durch stochastisch auftretende genetische (Nowell 1976) und epigenetische (Harris *et al.* 1982) Veränderungen hervorgerufen werden, was zur Entstehung einer genetisch heterogenen Neubildung führt. Unterschiede zwischen den Tumorzellen eines Tumors können auch durch extrinsische Mechanismen entstehen. So verursachen unterschiedliche Mikromilieus innerhalb eines Tumors phänotypische und funktionale Unterschiede zwischen Tumorzellen verschiedener Tumorregionen (Shackleton *et al.* 2009; Kreso und Dick 2014; Greaves und Maley 2012).

Einen anderen Ansatz zur Erklärung der Tumorerheterogenität beschreibt das Tumorstammzell-Modell. Dieses Modell formuliert, dass sich das tumorinitiierende Potenzial innerhalb eines Tumors lediglich auf eine kleine Subpopulation (Tumorstammzellen) beschränkt, die sich phänotypisch von der Mehrheit der Tumorzellen unterscheidet (Reya *et al.* 2001). Diese tumorinitiierenden Zellen weisen weitreichende Parallelen zum Stammzell-Phänotyp auf: (1) die Fähigkeit, ihre Eigenschaften über einen langen Zeitraum aufrechtzuerhalten: Selbsterneuerungspotenzial; (2) die Fähigkeit, alle ausdifferenzierten Zelltypen des jeweiligen Gewebes nachbilden zu können: Multipotenz; (3) eine niedrige Proliferationsrate; (4) asymmetrische Zellteilung. Im Gegensatz zur symmetrischen

Zellteilung, aus der zwei gleichwertige Tochterzellen hervorgehen, entstehen bei der asymmetrischen Zellteilung aus einer Stammzelle zwei unterschiedliche Tochterzellen: Eine Tochterzelle behält die Stammzeleigenschaften bei, sodass der Stammzellpool erhalten bleibt. Die andere wird zu einer sog. Progenitorzelle mit begrenztem Proliferationspotenzial und geht in die Hauptmasse der terminal differenzierten Gewebszellen ein. In normalen Geweben bilden die Stammzellen eine kleine Population innerhalb des Gewebes und stehen einer Masse von Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades gegenüber, wodurch eine Hierarchie im Gewebsaufbau entsteht (Barker und Clevers 2010; Dalerba *et al.* 2007). Analog stellt im Tumor eine Zelle mit tumorinitiierenden Fähigkeiten (Tumorstammzelle) den Ausgangspunkt sowohl für Zellen mit gleichem Selbsterneuerungspotenzial (Tochertumorstammzelle) als auch für nicht-tumorigene, genetisch homogene Progenitorzellen mit limitiertem Proliferationspotenzial dar, die für die Ausbildung der differenzierten Tumormasse verantwortlich sind. Dadurch spiegelt sich im Tumor die hierarchische Organisation von Normalgeweben wider, in der einer kleinen Stammzellpopulation eine Masse von ausdifferenzierten Zellen bzw. Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien gegenüberstehen (Reya *et al.* 2001; Ailles und Weissman 2007; Dalerba *et al.* 2007). Dieses Modell wurde Ende der 1980er-Jahre von Pierce formuliert (Pierce und Speers 1988) und gewann ab Mitte der 90er-Jahre an Bedeutung, als es erstmals gelang, anhand einer Kombination von Oberflächenmarkern eine kleine Subpopulation von tumorinitiierenden Zellen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zu identifizieren. Diese Zellen, die sich durch ein CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Oberflächenprofil auszeichneten und damit phänotypisch einer normalen hämatopoetischen Stammzelle ähnelten, machten nur ca. 0,2 % der gesamten Tumormasse aus. Dennoch war ausschließlich diese Zellfraktion in der Lage, in NOD/SCID-Mäusen (*nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency disease mice*) eine Leukämie zu initiieren. Dabei wiesen diese leukämischen Tumore einen heterogenen, hierarchischen Aufbau, bestehend aus CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen, auf und bildeten somit morphologisch den Ausgangstumor nach (Bonnet und Dick 1997). In nachfolgenden Untersuchungen konnte eine Reihe weiterer humaner Tumore identifiziert werden, die dem Tumorstammzellmodell entsprechend aufgebaut sind. Darunter sind Mamma-, Kolon-, Pankreas- und Ovarialkarzinome sowie Gehirn-, Leber- und Lungentumore (Pattabiraman und Weinberg 2014). Analog zu den normalen somatischen Stammzellen zeigen auch Tumorstammzellen eine geringe Proliferationsrate und lange G1/G0-Phasen sowie eine aktive DNA-Reparatur, erhöhte Apoptoseresistenz durch Expression von anti-apoptotischen Proteinen und die Expression von Effluxpumpen wie ABC-Transporter (*ATP binding cassette*). Dies ermöglicht den Tumorstammzellen, eine konventionelle Radio- und Chemotherapie, welche auf sich schnell teilende Tumorzellen ausgerichtet ist, zu überleben. Im Anschluss an die Therapie können diese Tumorstammzellen Folgetumore (Rezidive) ausbilden (Reya *et al.* 2001; Ailles und Weissman 2007). Da in Tumorzellen viele für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften essentielle Signaltransduktionswege wie Notch, Sonic Hedgehog (SH) und Wnt aktiv sind, werden verschiedene Entstehungsmechanismen von Tumorstammzellen diskutiert. Als Ursprung der Tumorstammzellen

können sowohl multipotente Gewebstammzellen fungieren, welche durch Akkumulation von genetischen und epigenetischen Mutationen aus dem Fließgleichgewicht zwischen Zellteilung und kontrolliertem Zelltod (Apoptose) ausbrechen, als auch wenig differenzierte Progenitorzellen oder ausdifferenzierte Körperzellen, welche durch Dedifferenzierungsprozesse Stammzeleigenschaften wiedererlangt haben (Dalerba *et al.* 2007; Pattabiraman und Weinberg 2014; Ebben *et al.* 2010).

In weiteren Untersuchungen auf dem Gebiet der Tumorstammzellen zeigte sich, dass die für die Identifizierung der Tumorstammzellen herangezogenen Marker nicht universell gültig sind. In Melanomen machten die Tumorzellen mit Tumorinitiationspotenzial (Tumorstammzellen) in Abhängigkeit vom Untersuchungsmodell  $\frac{1}{4}$  der Tumormasse aus (Quintana *et al.* 2008). Somit weisen nicht alle Tumore einen hierarchischen Aufbau auf, bei dem analog zum Tumorstammzellmodell einer kleinen Tumorstammzellpopulation eine Masse von Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien gegenübersteht. Die Heterogenität der Tumore, die nur eine flache bis keine Hierarchie zeigen, lässt sich besser über das Modell der klonalen Evolution erklären (Shackleton *et al.* 2009). Zudem zeigen Tumore eine starke genomische Instabilität, (Kreso und Dick 2014) während das Tumorstammzellmodell den Tumor als genetisch homogen betrachtet. Dies führte zu der Formulierung einer neuen Hypothese zur Erklärung der Tumorheterogenität, bei der das Stammzellmodell in das Modell der klonalen Selektion integriert wird (Abb. 1.1) (Kreso und



**Abb. 1.1: Funktionale Unterschiede zwischen den Zellen einzelner Subklone beeinflussen die Prognose und den Erfolg der Therapie.** Jeder genetische Subklone (verschiedene Farben) innerhalb eines Tumors setzt sich aus Zellen mit verschiedenen funktionalen Eigenschaften bezüglich des Selbsterneuerungspotenzials und der Proliferation zusammen. Eine Chemo-/Radiotherapie eliminiert schnell proliferierende Zellen. Die verbleibenden Zellen mit Selbsterneuerungspotenzial initiieren einen neuen Tumor mit unter Umständen vom Primärtumor abweichender Subklon-Zusammensetzung. Bild Kreso *et al.* 2014.

Dick 2014; Clevers 2011). Es wird der Einfluss der genetischen Heterogenität der Tumore, das stammzellähnlichen Charakters der Tumorzellen und das Tumormikromilieu auf das Verhalten des Tumors berücksichtigt. In diesem Modell erhält eine Zelle durch Akkumulation von genetischen Veränderungen (intrinsische Faktoren) die Fähigkeit zur klonalen Expansion, die in der Ausbildung des ersten Tumorklons resultiert. Innerhalb des Klons entwickeln sich unter dem Einfluss unterschiedlicher intrinsischer und extrinsischer Faktoren (Tumormikromilieu) verschiedene Subklone. Diese Subklone enthalten sowohl nicht-tumorinitierende Tumorzellen als auch

unterschiedliche Anteile an tumorinitiierenden Zellen (Tumorstammzellen). Im weiteren Verlauf der Tumorprogression steigt unter dem Einfluss von selektionsfördernden intrinsischen und extrinsischen Faktoren die Selbsterneuerungskapazität der Tumorzellen und damit der Malignitätsgrad des Tumors an. Dies führt zu einem stetigen Anstieg der Zahl der tumorinitiierenden Zellen und einer abflachenden Hierarchie innerhalb der jeweiligen Subklone bis im Extremfall Subklone mit funktionaler Homologie entstehen. Die konventionelle Chemo- und Radiotherapie trifft die sich schnell teilenden Zellen. Von den verbleibenden Tumorzellen sind nun nur solche für die Rezidivierung von Bedeutung, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Dieser Anteil kann abhängig vom Grad der Tumorprogression unterschiedlich hoch sein und unterliegt nun wiederum der klonalen Selektion (Clevers 2011; Kreso und Dick 2014). Somit bleibt die treibende Kraft hinter der Tumorprogression und Metastasierung das Potenzial der Tumorzellen zur Selbsterneuerung. Dabei spielt es keine Rolle, ob nur wenige oder die meisten Zellen innerhalb eines Tumors über das Selbsterneuerungspotenzial verfügen. Für ein besseres Verständnis der Tumorbiologie ist es essentiell, die stammzellbiologischen Vorgänge zu verstehen.

### 1.3 Metastasierung und Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Die Metastasierung ist für über 90 % der tumorassoziierten Todesfälle verantwortlich (Chaffer und Weinberg 2011). Der Metastasierungsprozess ist durch zwei Hauptereignisse gekennzeichnet: Zunächst lösen sich die Zellen des Primärtumors aus dem Zellverband, bewegen sich in das umliegende Gewebe und infiltrieren angrenzende Lymph- und Blutgefäße; anschließend verlassen die Tumorzellen das Gefäßsystem an einer entfernten Stelle und wandern dort ins Gewebe ein, um sekundäre Tumore (Metastasen) zu bilden (Chaffer und Weinberg 2011; Liu *et al.* 2013a). Um die Fähigkeit zur Migration und Invasion zu erlangen, erfordert es den Verlust der Zelladhäsion im Austausch gegen eine erhöhte Zellmotilität, ein Vorgang der im Allgemeinen als Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird (Liu *et al.* 2013a). EMT ist als ein zellulärer Prozess definiert, bei dem epitheliale Zellen Eigenschaften mesenchymaler Zellen erlangen. Der reverse Prozess, bei dem mesenchymale Zellen epitheliale Eigenschaften entwickeln, wird als Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) bezeichnet (Brabletz 2012). Epithelien bestehen aus Schichten polarisierter Zellen, die miteinander über verschiedene Membranstrukturen wie Desmosomen, Adhärens-Kontakte (*Zonula adhaerens*), Kommunikationsverbindungen (Nexus) und Barrierekontakte (*Zonula occludens*) verbunden sind. Im Gegensatz dazu weisen mesenchymale Zellen keine apikal-basolaterale Polarisation auf und sind locker in der dreidimensionalen extrazellulären Matrix organisiert. Die Prozesse der EMT und MET ermöglichen es, diesen beiden Zelltypen trotz ihrer unterschiedlichen Phänotypen und unterschiedlicher Funktionen unter bestimmten Bedingungen ineinander übergehen zu können (Brabletz 2012). Dies spielt eine zentrale Rolle während der Embryogenese und im normalen adulten Gewebe, beispielsweise beim Wundheilungsprozess (Thiery *et al.* 2009; Pérez-Pomares und Muñoz-Chápuli 2002; Nakamura und Tokura 2011). Während des EMT-Prozesses durchlaufen Zellen eine Reihe von tiefgreifenden

morphologischen und molekularen Veränderungen, die es ihnen ermöglichen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen zu lösen und zu migrieren: (1) Die Zellpolarität geht zugunsten einer spindelförmigen Morphologie – ähnlich der von mesenchymalen Zellen – verloren. (2) Die Genexpression von Zelladhäsionsproteinen wie E-Cadherin oder Occludin wird reduziert, während die Expression von mesenchymalen Zytoskelettproteinen wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin verstärkt wird. Ein Prozess, welcher überwiegend durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SNAI1 (*snail family zinc finger 1*), SNAI2 (*snail family zinc finger 2*), und TWIST (*twist family bHLH transcription factor*) reguliert wird. (3) Die Reorganisation des Aktinskeletts von kortikalem Aktin zu Stressfasern (*stress fibers*) resultiert im Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zell-Adhäsion. (4) Die Zellen erlangen die Fähigkeit, zu migrieren (Christofori 2006; Liu *et al.* 2013a; Roy *et al.* 2011; Ponnusamy *et al.* 2010).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumorprogression, der Metastasierung und der Aktivierung des EMT-Programms (Brabletz 2012). Obwohl in den meisten Tumoren eine vollständige EMT, also der komplette Verlust von epithelialen Markern zugunsten von mesenchymalen Markern, nicht beobachtet wurde, erhöhte eine Initiation der EMT die Motilität und Dissemination von Tumorzellen in verschiedenen Tumorentitäten (Thiery *et al.* 2009; Rhim 2013; Craene und Berx 2013). Außerdem lassen die Analysen der Genexpressionsmuster humaner Tumore vermuten, dass dedifferenzierte Tumorzellen den EMT-Phänotyp und stammzellähnliche Eigenschaften in sich kombinieren, was zur Formulierung des Konzepts der migrierenden Tumorstammzelle als Basis für die Metastasierung führte (Brabletz *et al.* 2005; Battula *et al.* 2010). Neben EMT nimmt MET eine zentrale Stellung bei der erfolgreichen Metastasierung und Kolonisation – bei der Ausbildung von Fernmetastasen – ein. Der EMT-assoziierte Wachstumsarrest befähigt die Zellen zwar, zu disseminieren und in entfernte Gewebe einzuwandern, für die Ausbildung von Makrometastasen ist jedoch die Proliferation und damit der Wiedereintritt in den Zellzyklus erforderlich, wofür Prozesse der MET durchlaufen werden müssen (Craene und Berx 2013; Brabletz 2012).

In Tumoren erfolgt die Aktivierung des EMT-Programms durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signale und Signaltransduktionswege. Die Signalgebung erfolgt sowohl parakrin, durch das Tumorstroma, als auch autokrin durch die Tumorzellen selbst (Scheel *et al.* 2011). Diese Signale stellen unter anderem Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Collagen und verschiedene lösliche Wachstumsfaktoren – beispielsweise TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) oder kanonische und nicht-kanonische WNTs dar. Diese Signalkaskaden induzieren die Expression von EMT-spezifischen Transkriptionsfaktoren, darunter Proteine der SNAI1-, TWIST- und ZEB-Proteinfamilie (*zinc finger E-box-binding homeobox*), welche als Masterregulatoren der EMT bezeichnet werden. Diese EMT-Masterregulatoren gestalten das Genexpressionsprofil der Zelle so um, dass die Expression epithelialer Gene reprimiert, während die Expression mesenchymaler Gene aktiviert wird. Dies hat wiederum die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps zur Folge (Talbot *et al.* 2012). Als das wichtigste Ereignis dabei wird die transkriptionelle Repression des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin durch TWIST und SNAI1/2 betrachtet. Während die parakrinen Signale die EMT induzieren, wird der

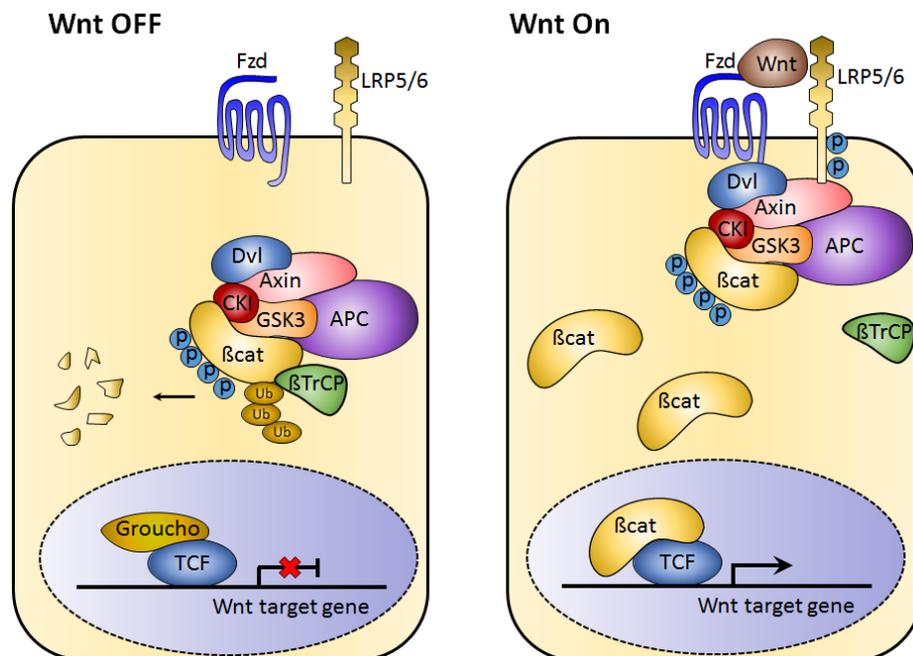
erlangte mesenchymale Status der Zelle über autokrine Signale beibehalten, auch wenn die Zelle analog zum Disseminierungsvorgang den parakrinen EMT-induzierenden Signalen nicht mehr ausgesetzt ist (Scheel *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der EMT durch eine Reihe von Signaltransduktionswegen initiiert wird, welche auch in die Induktion und die Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotenzials von Stammzellen involviert sind. Darunter sind die Signaltransduktionswege Wnt, TGF- $\beta$ , Prostaglandin E, Sonic Hedgehog, NOTCH und PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) zu finden (Lamouille *et al.* 2014). Das Zusammenspiel von autokrinen und parakrinen Signalen zeichnet ein komplexes Bild beim Wechsel zwischen epithelialen und mesenchymalen, stammzellähnlichen Charakteristika von Tumorzellen. Es wird deutlich, dass epitheliale Tumorzellen durch die Aktivierung des EMT-Programms in einen phänotypischen Zustand eintreten, bei dem bestimmte epitheliale Marker erhalten bleiben, während sie zusätzliche mesenchymale Marker exprimieren, was in einer partiellen EMT resultiert. (Celià-Terrassa *et al.* 2012; Battula *et al.* 2010).

#### 1.4 Wnt-Signaltransduktionsweg

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist evolutionär stark konserviert. WNT-Faktoren waren in multizellulären Organismen wahrscheinlich bereits vor der Artenexplosion des Kambrium vor 550 Millionen Jahren vorhanden (Kusserow *et al.* 2005). Die Bezeichnung WNT setzt sich aus *Wg* (*Wingless; Drosophila melanogaster*) und *Int-1* (*Integration-1; Maus*) zusammen. Dieser Signaltransduktionsweg spielt eine zentrale Rolle sowohl in der Embryonalentwicklung als auch bezüglich der Gewebemöostase, Regeneration oder der Wundheilung von Organsystemen. Ferner ist der Wnt-Signaltransduktionsweg in der Zellmigration, bei der Aufrechterhaltung genetischer Stabilität und der Apoptose beteiligt. Dieses weite Funktionsspektrum erfordert eine genaue Regulation der Signalkaskade. Eine Deregulation dieses Signalweges ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter Tumorerkrankungen, assoziiert (Clevers und Nusse 2012; Kahn 2014). Die Liganden, welche die Wnt-Signalkaskade aktivieren, sind die WNT-Proteine. Dabei handelt es sich um evolutionär konservierte, sekretierte cysteinreiche Glykoproteine. Säugergenome weisen 19 WNT-Gene auf, welche auf 12 konservierte Unterfamilien verteilt sind (Clevers und Nusse 2012). WNT-Proteine fungieren als Morphogene (Logan und Nusse 2004). Die Mitglieder der WNT-Proteinfamilie binden an Frizzled-Rezeptoren. Frizzled (FZD) sind 7-Transmembranrezeptoren mit einer N-terminalen, cysteinreichen Extrazellulärdomäne (ECD) und gehören phylogenetisch der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an (Angers und Moon 2009; Clevers 2006). An der Regulation der Wnt-Signalkaskade sind eine Vielzahl von Inhibitoren (z. B. DKK1 (*dickkopf-related protein 1*), KREMEN1 (*kringle containing transmembrane protein 1*)) und Aktivatoren (z. B. Norrin (*Norrie disease protein*), R-Spondine) beteiligt. Deren Expression wird größtenteils durch den Wnt-Signalweg selbst, im Zuge von negativen oder positiven *feed back*-Schleifen reguliert. Dadurch kann eine exakte Feinregulierung des Weges sichergestellt werden (Malinauskas und Jones 2014; Niehrs 2012; MacDonald *et al.* 2009).

Es wird zwischen dem klassischen kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg, der über die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF-Transkriptionskomplexes (*T-cell specific, HMG-box/lymphoid enhancer binding factor*) vermittelt wird und dem nicht-kanonischen Weg unterschieden, bei dem die WNT-Proteine eine Reihe alternativer, zellulärer Antworten auslösen. Jedoch kann diese Klassifizierung lediglich als eine grobe Unterteilung angesehen werden, da zahlreiche Überkreuzungen zwischen den einzelnen „Armen“ des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges bestehen. Welche zelluläre Reaktion durch die Bindung eines WNT-Liganden induziert wird, hängt im Wesentlichen vom zellulären Kontext ab und wird durch die Kombination des jeweiligen WNT-Liganden, Frizzled-Rezeptors und der beteiligten Co-Rezeptoren bestimmt (Niehrs 2012; Veeman *et al.* 2003a). Der bis dato am besten charakterisierte Arm der Wnt-Signalkaskade ist der kanonische Wnt-Signalweg. Innerhalb dieses Signalweges nimmt das Protein  $\beta$ -Catenin eine zentrale Stellung ein.  $\beta$ -Catenin übernimmt in Abhängigkeit von seiner zellulären Lokalisation unterschiedliche Funktionen. Einerseits ist  $\beta$ -Catenin an den Adhärens-Kontakten (*Zonula adhaerens*) lokalisiert. Hier stellt es einen essentiellen Bindungspartner für die zytoplasmatische Domäne verschiedener Cadherine wie E-Cadherin dar. Dadurch ist  $\beta$ -Catenin an der Verankerung des Aktinzytoskeletts an den Adhärens-Kontakten beteiligt und in die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten involviert (Clevers 2006). Andererseits kann  $\beta$ -Catenin auch im Zellkern lokalisiert sein, wo es die Transkription von Wnt-Zielgenen reguliert. Die Kontrolle des freien  $\beta$ -Catenin-Proteinpools der Zelle erfolgt im Zytoplasma durch den sog. Abbaukomplex (Abb. 1.2). Der zytoplasmatische Abbaukomplex ist ein Multiproteinkomplex, bei dem AXIN (*axis inhibition protein*) als Gerüstprotein fungiert. Es interagiert direkt mit allen anderen Komponenten des Komplexes, darunter  $\beta$ -Catenin, APC (*adenomatous polyposis coli*) und den Kinasen der Familien GSK3 ( $\alpha$  und  $\beta$ ) (Glykogen Synthase Kinsase) und CK1 (Casein Kinase 1) ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). In Abwesenheit von extrazellulären WNT-Liganden wird  $\beta$ -Catenin durch die Kinasen GSK3 und CK1 an hochkonservierten Ser/Thr-Resten am N-terminus phosphoryliert, wodurch es für die Ubiquitylierung durch die E3-Ubiquitinligase  $\beta$ TrCP (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) und den anschließenden proteosomalen Abbau markiert wird (Cadigan und Peifer 2009; MacDonald *et al.* 2009; Clevers 2006). Dadurch wird in Abwesenheit eines WNT-Signals der zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel in der Zelle gering gehalten. Die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Rezeptor der Frizzled-Familie resultiert in der Stabilisierung und Anreicherung des zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Pools. Der dahinterstehende molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Nach einem aktuellen Modell initiiert die WNT-Ligandenbindung die Ausbildung eines Proteinkomplexes zwischen WNT, Frizzled und dem Co-Aktivatoren LRP5 oder LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*). Bei dem Co-Aktivatoren LRP5/6 (5 oder 6) handelt es sich um ein *single pass*-Transmembranprotein der LRP-Familie. Nachfolgend wird die zytoplasmatische Domäne des LRP5/6 durch die Kinase GSK3 und die membranständige CK1 $\gamma$ -Kinase phosphoryliert, wodurch eine Interaktion mit Axin ermöglicht wird. Das in Folge der WNT-Ligandenbindung an FZD (Frizzled) rekrutierte zytoplasmatische Phosphoprotein DVL (*dishevelled*) interagiert ebenfalls mit

AXIN und dient darüber hinaus als Plattform für die Rekrutierung des Abbaukomplexes an der Zellmembran. In Folge der Translokation des Abbaukomplexes an die Membran wird die Ubiquitinylierung des phosphorylierten  $\beta$ -Catenin blockiert und der Abbaukomplex mit der phosphorylierten Form des  $\beta$ -Catenins gesättigt. Dies ermöglicht die Akkumulation von neu synthetisiertem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und dessen Translokation in den Zellkern, wo es im Komplex mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie die Transkription von Wnt-Zielgenen aktiviert (Li *et al.* 2012). In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin bindet TCF/LEF an Proteine der GROUCHO-Familie (TLE: *transducin like enhancer of split*) und fungiert in diesem Komplex als ein Transkriptionsrepressor der Wnt-Zielgene. Das  $\beta$ -Catenin verdrängt GROUCHO vom TCF/LEF Komplex, der nun transient als Transkriptionsaktivator von Wnt-Zielgenen wirkt (Abb. 1.2) (MacDonald *et al.* 2009; Clevers 2006).



**Abb. 1.2: Kanonischer Wnt-Signaltransduktionsweg.** Schematische Darstellung des Modells der Regulation der  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung. Bild modifiziert nach Liu *et al.* 2012.

Unter dem Begriff des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges werden die Signaltransduktionswege zusammengefasst, bei denen das WNT-Signal nicht über das  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF Modul vermittelt wird, sondern durch eine Reihe anderer Faktoren wie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), CamKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II*) oder PKC (Proteinkinase C). Die am besten charakterisierten nicht-kanonischen Wnt-Signalwege sind der *planar cell polarity* (PCP)-Signalweg und der Wnt/Calcium-Signalweg (Veeman *et al.* 2003a; Angers und Moon 2009). In Vertebraten werden diese Wege mit verschiedenen biologischen Prozessen wie z. B. der Gastrulationsbewegung, der Augenentwicklung oder der Neuralleistenwanderung sowie der Tumorentwicklung in Verbindung gebracht (Angers und Moon 2009). Über den Mechanismus der Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges ist nur wenig bekannt. Es wird zwischen „kanonischen“

WNT-Proteinen (WNT-Proteine die den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren) (z. B. WNT3A) und den „nicht-kanonischen“ WNT-Proteinen (welche den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren) (z. B. WNT11) unterschieden. Jedoch wurde gezeigt, dass beispielsweise WNT11 FZD-abhängig auch den kanonischen ( $\beta$ -Catenin abhängigen) Wnt-Signalweg aktivieren kann (Tao *et al.* 2005). So ist es hauptsächlich von dem FZD-Rezeptor und/oder dem Co-Liganden abhängig, welcher Weg initialisiert wird. Zudem können auch eine Reihe anderer Rezeptoren wie RYK (*receptor-like tyrosine kinase*) als WNT-Rezeptoren fungieren und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg initialisieren. Bei der Initialisierung der nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade führt die WNT-Ligandenbindung zur Aktivierung von trimären G-Proteinen und/oder DVL, welchen die *downstream* Initialisierung des PCP- oder des Wnt/Calcium-Signalweges vermitteln. Damit stellt das Phosphoprotein DVL, das in Säugern aus drei Familienmitgliedern besteht und hoch konserviert ist, einen Verbindungspunkt zwischen dem  $\beta$ -Catenin abhängigen und unabhängigen Wnt-Signalweg dar (Angers und Moon 2009; Kahn 2014).

Zelltyp- und gewebsspezifisch werden durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges verschiedene transkriptionelle Programme initiiert, welche eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse wie die Zellproliferation, die Migration aber auch die terminale Differenzierung regulieren (Clevers 2006). Die bis dato identifizierten TCF/LEF-Zielgene sind auf der Wnt-Homepage (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>) aufgelistet. Darunter sind Regulatoren der Proliferation wie *MYC* und *CCND1* (Cyclin D1), sowie die EMT-Masterregulatoren *TWIST1* und *SNAI1/2* (1 und 2) zu finden. Daraus ergibt sich eine enge Verknüpfung zwischen dem EMT-Programm und dem Wnt-Signalweg (Kalluri und Weinberg 2009). Darüber hinaus sind die als Stammzellmarker beschriebenen Transkriptionsfaktoren *OCT3/4*, *SOX2* und *NANOG* Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges. Dies verdeutlicht eine Verknüpfung des Wnt-Signalweges mit Prozessen, welche die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften steuern (Reya und Clevers 2005).

Eine Deregulation der Wnt-Signalkaskade ist mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert. Zudem steht die Entstehung und Progression von vielen Tumoren mit einer unkontrollierten Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges in Verbindung (Clevers und Nusse 2012; MacDonald *et al.* 2009). Der Wnt-Signalweg beinhaltet sowohl Komponenten, die als Tumorsuppressoren wirken. Diese zeigen in Tumoren häufig *loss of function*-Mutationen. Der Wnt-Signalweg enthält aber auch Komponenten, welche die Tumorprogression fördern können. Diese sind in Tumoren aktiviert (*gain of function*). In beiden Fällen führen Mutationen in solchen Komponenten zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges (Polakis 2012). Ein bekanntes Beispiel ist das hereditäre FAP-Syndrom (familiäre adenomatöse Polyposis coli). Eine heterozygote *loss of function*-Keimbahnmutation des *APC*-Gens resultiert hier in einer kontinuierlichen Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges. FAP-Patienten entwickeln als Folge einer *APC*-Mutation in einem Allel eine Vielzahl kolorektaler Adenome. Diese benignen Polypen können bei Akkumulation einer *APC*-Mutation im zweiten Allel zu malignen Adenokarzinomen progressieren (Clevers und Nusse 2012). Weiterhin wurden *loss of function*-Mutationen im *AXIN*-Gen sowie *gain of function*-Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen in einer

Vielzahl verschiedener humaner Tumoren beschrieben, darunter Leber- und Schilddrüsentumore (Kahn 2014; Clevers und Nusse 2012). Darüber hinaus wurden epigenetische Stilllegungen der negativen Regulatoren des Wnt-Signalweges wie SFRPs (*secreted frizzled-related proteins*) in Tumoren beobachtet (Kahn 2014; Polakis 2012). Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass der Wnt-Signalweg in Tumoren eine duale Rolle übernimmt und Prozesse wie Tumorinitiation, -wachstum, Metastasierung und Therapieresistenz in Abhängigkeit von Tumorstadium und Tumorart sowohl inhibieren als auch fördern kann (Anastas und Moon 2013). Beispielsweise ist in Melanomen ein aktiver Wnt-Signalweg mit einem niedrigen Proliferationsindex und einer besseren Überlebensprognose korreliert (Kageshita *et al.* 2001; Maelandsmo *et al.* 2003). Das breite Funktionsspektrum und die Komplexität der Regulation des Wnt-Signalweges unterstreichen dessen Bedeutung bei der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung.

## 1.5 LGR5

### 1.5.1 Klassifikation und struktureller Aufbau

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR: *G-protein coupled receptor*) sind Transmembranrezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Übertragung diverser extrazellulärer Signale in entsprechende zelluläre Reaktionen spielen. Sie sind somit an der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt (Müller *et al.* 2008). Das Spektrum der Stimuli, die über GPCRs weitergeleitet werden, reicht von Ionen über Peptide, Proteine, Lipide, Nukleotide bis hin zu Lichtphotonen (Kristiansen 2004). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden mit über 800 kodierten Genen im Menschen die größte Proteinfamilie unter den Membranrezeptoren (Fredriksson *et al.* 2003).

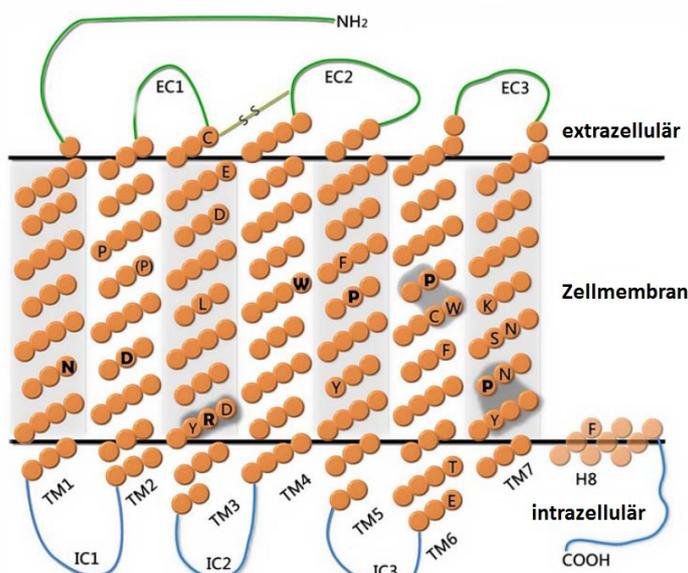


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Bild (Trzaskowski *et al.* 2012).

Trotz der großen sequenziellen Unterschiede weisen alle Mitglieder der GPCR-Superfamilie eine gemeinsame Struktur auf (Abb. 1.3): (1) Eine 7-Transmembrandomäne (TM7) bestehend aus sieben

$\alpha$ -Helices, welche über drei extrazelluläre (EC1-3) und drei intrazelluläre (IC-1-3) Schleifen verbunden sind. (2) Eine extrazelluläre, N-terminale Domäne (ECD), welche die Ligandeninteraktion vermittelt. (3) Eine intrazelluläre, C-terminale Domäne, die mit G-Proteinen, Arrestinen oder anderen *downstream* Effektoren interagiert (Latek *et al.* 2012). Infolge einer Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne und dem Liganden erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors mit einer massiven Umstrukturierung der zytoplasmatischen Domäne, wodurch die Bindestellen für intrazelluläre Effektormoleküle zugänglich werden und so die zelluläre Antwort eingeleitet wird (Kristiansen 2004).

Die ursprüngliche Aufteilung aller GPCRS von Vertebraten und Evertrebraten erfolgte anhand von Sequenzhomologien und funktioneller Gemeinsamkeiten in sechs Klassen: Rhodopsin- (A), Sekretin- (B), Glutamat- (C), fungale Pheromon-P- und  $\alpha$ -Faktor- (D), fungale Pheromon-A- und M-Faktor- (E) und zyklische-AMP-Rezeptoren (F) (Attwood und Findlay 1994; Kolakowski 1994). Zur Klassifizierung der humanen GPCR-Superfamilie wird das GFAFS-System herangezogen. Dabei erfolgt die Aufteilung der GPCR-Superfamilie basierend auf phylogenetischen Analysen in fünf Klassen: Glutamat, Rhodopsin, Adhäsion, Frizzled/Taste2 und Sekretin (Schiöth und Fredriksson 2005). Die Rezeptoren der Rhodopsin-Klasse werden weiter in vier Gruppen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  und  $\delta$  unterteilt. Zu der Gruppe  $\delta$  gehören unter anderem die *leucine-rich repeat-containing*-Rezeptoren (LGRs) (Fredriksson *et al.* 2003).

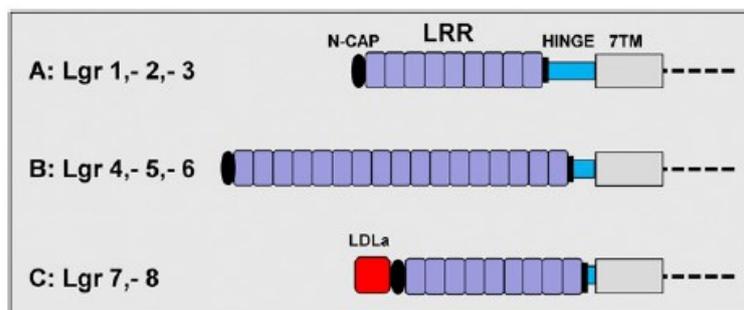


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von LGR1-8.. Bild (Lau *et al.* 2014).

Die LGR-Proteinfamilie zeichnet sich durch eine große extrazelluläre Domäne aus. Diese setzt sich aus einer Serie von Leucin-reichen Wiederholungen (LRRs: *leucin-rich repeats*) zusammen und ist von je einem Cystein-reichen Cap-Modul am N- und C-Terminus flankiert. Das LRR-Strukturmotiv besteht aus 24 Aminosäuren und weist eine Reihe hochkonservierter Leucine auf. In der Tertiärstruktur bildet eine Serie von LRRs eine  $\alpha/\beta$ -Hufeisen-Struktur (Hsu *et al.* 2000). Die LGR-Proteinfamilie wird in drei Gruppen aufgeteilt (Abb. 1.4) (van Hiel *et al.* 2012; van Loy *et al.* 2008). Gruppe-A-Rezeptoren (LGR1-3) sind durch das Vorhandensein von sieben bis neun LRRs in der Extrazellulärdomäne und einer langen Gelenkregion (HINGE), welche die extrazelluläre Domäne mit der 7TM Domäne verbindet, charakterisiert. Rezeptoren der Gruppe C (LGR7 und 8) beinhalten ebenfalls sieben bis neun LRRs aber eine kürzere Gelenkregion und ein zusätzliches LDLa-Motiv (*low-density lipoprotein receptor class A*). Die Klasse-B-Rezeptorfamilie, welche LGR4, LGR5 und LGR6 beinhaltet, ist durch

das Vorhandensein von 13 bis 18 LRRs in der extrazellulären Domäne charakterisiert (Kumar *et al.* 2014). In den Fokus des Interesses rückten vor allem die Mitglieder der LGR-Proteinfamilie LGR5 und LGR6, da sie als putative Marker für Stammzellen im Darm und Haarfollikel identifiziert wurden und sich eine Relevanz, besonders von LGR5, für die Tumorprogression zeigen lassen konnte (Barker *et al.* 2007; Tan und Barker 2015). Das *LGR5*-Gen ist ca. 144kb lang und auf Chromosom 12 an der Position 12q22-q23 lokalisiert. Es kodiert für ein 907 Aminosäuren großes Protein ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_003658.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003658.1)).

### 1.5.2 Funktion

Erstmals wurde *LGR5* als Wnt-Zielgen und Stammzellmarker von der AG Clevers beschrieben. *LGR5* war eines von 80 Genen, welche in humanen Kolontumorzellen nach Verlust des Wnt-Regulators APC stark aktiviert wurden, aber auch in Darmkrypten physiologisch aktiv waren (van de Wetering, Marc *et al.* 2002; van der Flier, Laurens G *et al.* 2007). Die Expression von *LGR5* im Darm der Maus beschränkte sich auf die Zellen am Grund der Krypten, welche zwischen den Paneth-Zellen eingebettet sind und als *crypt base columnar* (CBC) bezeichnet werden. Diese Zellen wurden bereits 1974 durch Cheng und Leblond als potenzielles Stammzellkompartiment im Dünndarm beschrieben (Cheng und Leblond 1974). Die Validierung der LGR5-positiven Zellen im Darm als Stammzellen wurde durch die Einführung der *lineage tracing*-Methode ermöglicht. Dabei wird ein genetischer Marker (LacZ oder Fluoreszenzprotein) induzierbar unter Kontrolle des Promotors eines potenziellen Stammzellgens gestellt. Nach der Induktion wird jede Zelle, in der dieser Promotor aktiviert wird, irreversibel angefärbt und vererbt zudem diese Markierung an jede Tochterzelle weiter, auch wenn der Promotor im Laufe der Zeit stillgelegt wird. So wurde gezeigt, dass die LGR5-positive CBC-Zellen in der Maus in der Lage sind, sich zu allen Zelltypen des Darmepithels zu differenzieren (Multipotenz) und ein Jahr nach der Induktion immer noch aktiv sind (Selbsterneuerungspotenzial) (Barker *et al.* 2007). LGR5 wurde daraufhin in einer Reihe weiterer Organsysteme als Stammzellmarker beschrieben (Tabelle 1.1). Weiterhin konnten aus dem Dünndarm der Maus isolierte LGR5-positive CBC-Zellen zu dreidimensionalen Organoiden heranwachsen, welche akkurat die zelluläre Zusammensetzung und die Architektur des intestinalen Epithels widerspiegeln. Diese Beobachtungen bestätigten weiterhin das LGR5 als Stammzellmarker (Sato *et al.* 2009). Im Gegensatz zu den postulierten Stammzeleigenschaften weisen LGR5-positive Zellen eine hohe Proliferationsrate auf und teilen sich weitaus häufiger symmetrisch als asymmetrisch (Snippert *et al.* 2010; Schepers *et al.* 2011). Die Gewebshomöostase wird dabei durch neutrale Competition zwischen den Tochterzellen aufrechterhalten. Die Beibehaltung der Stammzeleigenschaften wird vorwiegend durch die Stammzellnische vermittelt. So können nur Tochterzellen, welche einen Platz in der Stammzellnische finden, Stammzellen bleiben, anderenfalls wird der Differenzierungsprozess eingeleitet. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der LGR5-positive Stammzellen wurde postuliert, dass diese Stammzellen die konstitutive Erneuerung des Darmepithels vermitteln (Barker *et al.* 2007; Snippert *et al.* 2010; Schepers *et al.* 2011). In Organsystemen, die nur einer niedrigen Erneuerungsrate unterliegen (z. B. Leber),

werden LGR5-positive Stammzellen erst nach Verletzung – als Folge der Aktivierung des Wnt-Signalweges – erzeugt und sind am Heilungsprozess beteiligt (Huch *et al.* 2013b).

Während der Embryonalentwicklung weist *LGR5* ein breites und komplexes Expressionsmuster auf, dagegen ist in ausgewachsenen Mäusen die *LGR5*-Expression auf einzelne Zellen im Auge, Gehirn, Haarfollikel, Brustdrüse, Reproduktionsorgane und auf den Magen-Darm-Trakt beschränkt (Barker und Clevers 2010).

**Tabelle 1.1:** Zusammenstellung der Organe in denen LGR5-positive Stammzellen nachgewiesen wurden (Stand 2015)

Gewebe	Studie
Dünn- und Dickdarm	(Barker und Clevers 2007)
Magen	(Barker und Clevers 2010)
Haarfollikel	(Jaks <i>et al.</i> 2008)
Leber	(Huch <i>et al.</i> 2013b)
Bauchspeicheldrüse	(Huch <i>et al.</i> 2013a)
Nieren	(Barker <i>et al.</i> 2012)
Brustdrüse	(Visser <i>et al.</i> 2012; Plaks <i>et al.</i> 2013)
Prostata	(Wang <i>et al.</i> 2015)
Ovar	(Ng <i>et al.</i> 2014)
Hämatopoetisches System	(Liu <i>et al.</i> 2014)
Embryonales zentrales Nervensystem	(Hermey <i>et al.</i> 1999)
Cochlea	(Shi <i>et al.</i> 2012)

Ein homozygoter *LGR5 knockout* führt zu einer 100%igen neonatalen Letalität in Mäusen, als Folge der Fusion der Zunge mit dem Mundboden (Morita *et al.* 2004). Zudem weisen *LGR5*-Null-Mäuse Entwicklungsstörungen im embryonalen Darm auf (Garcia *et al.* 2009). Während ein *LGR5 knockout* nur leichte Effekte auf die Integrität der Darmkrypten hat, resultiert ein kombinierter *knockout* von *LGR5* und seinem Homolog *LGR4* in einem Verlust der Kryptenarchitektur *in vivo* in der Maus und verhindert die Ausbildung von Organoiden *in vitro*. Dies geht mit einer verminderten Genexpression der Stammzell- und Wnt-Zielgene einher und weist wiederum auf die Rolle beider Proteine für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften hin (Lau *et al.* 2011).

### 1.5.3 Wirkmechanismus

Für das Verständnis des zellulären Wirkmechanismus von LGR5 war die Identifikation der R-Spondine als Liganden der LGRs 4, 5 und 6 von entscheidender Bedeutung (Carmon *et al.* 2011; Glinka *et al.* 2011; Ruffner *et al.* 2012).



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der R-Spondine 1-4. Bild (Lau *et al.* 2014).

Die vier sezernierten R-Spondine (RSPO1-4) sind ca. 35kDa große Proteine, die untereinander eine Homologie von 40 bis 60 % aufweisen. Die humanen RSPOs (1-4) weisen am N-Terminus neben der hydrophoben Sekretionssequenz zwei cysteinreiche Furin-ähnliche (FU) Wiederholungen (FU1 und

FU2) auf, gefolgt von einer TSR-Domäne (*thrombospondin type I repeat*) und einer BR- Domäne (*basic amino acid-rich*) am C-Terminus (Abb. 1.5). Biologisch stellen R-Spondine Agonisten des Wnt-Signalweges dar (Kumar *et al.* 2014).

Alle vier R-Spondine binden mit hoher Affinität an LGR4, 5 sowie 6 und vermitteln so eine Signalverstärkung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen (kanonischen) Wnt-Signalweges (Carmon *et al.* 2011). Der dahinterstehende molekulare Mechanismus ist allerdings noch kaum entschlüsselt. Eine Beteiligung von G-Proteinen oder  $\beta$ -Arrestin konnte nicht gezeigt werden, sodass ein von der typischen GPCR-Signaltransduktion abweichender Mechanismus vermutet wird (Carmon *et al.* 2011; Lau *et al.* 2011). Ein besserer Einblick in diesen Mechanismus ergab sich aus Untersuchungen zur Funktionsweise der Wnt-Ziel- bzw. stammzellassozierten Gene *RNF43* (*ring finger 43*) und *ZNRF3* (*zinc and ring finger 3*). Die Expression der Transmembran-E3-Ubiquitin-Ligase *RNF43* und dessen Homolog *ZNRF3* ist spezifisch für LGR5-positive CBC-Zellen. *RNF43* und *ZNRF3* gehören der Familie der RING Domäne E3-Ligasen an und weisen neben der typischen RING-Domäne am C-Terminus, welche die E3-Ligaseaktivität beinhaltet, eine Transmembranhelix und eine extrazelluläre N-terminale PA-Domäne (*proteinase-associated*) auf (Abb. 1.6) (Peng *et al.* 2013b).

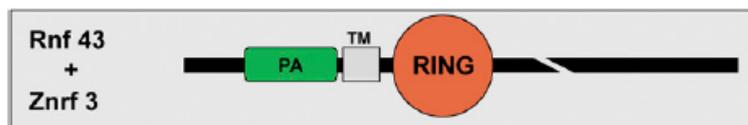
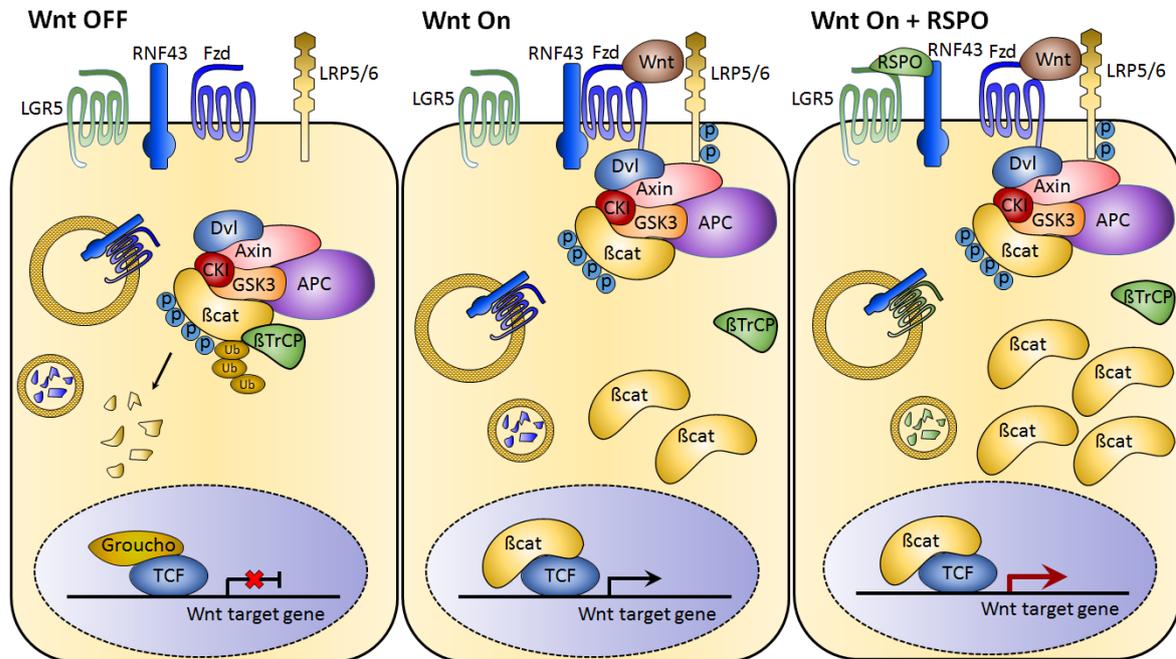


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *RNF43/ZNRF3*. Bild (Lau *et al.* 2014).

*RNF43* und *ZNRF3* vermitteln spezifisch die Polyubiquitylierung von Lysinresten in den zytoplasmatischen Loops der sieben Transmembrandomäne der Frizzled-Rezeptoren, was eine rapide Endozytose der Frizzled-Rezeptoren und deren lysosomalen Abbau zur Folge hat. Somit regulieren *RNF43* und *ZNRF3* die Zelloberflächenexpression der Frizzled-Rezeptoren und fungieren als negative *feedback*-Regulatoren des Wnt-Signalweges (Koo *et al.* 2012; Hao *et al.* 2012). Die *RNF43/ZNRF3* abhängige-Frizzled-Internalisierung wird in Anwesenheit der R-Spondine verhindert (Hao *et al.* 2012). In proteinkristallographischen Untersuchungen wurde die Ausbildung eines Proteinkomplexes zwischen *LGR5*, *RNF43* und *RSPO1* beobachtet (Chen *et al.* 2013; Zebisch und Yvonne Jones 2015). Dabei erfolgte die Formation eines 2:2:2 (*LGR5:RNF43:RSPO1*)-Proteinkomplexes (Chen *et al.* 2013; Lau *et al.* 2011). In diesem Komplex interagieren *LGR5* und *RNF43* nicht direkt miteinander. Stattdessen fungiert das *RSPO1* als eine Brücke zwischen den beiden Proteinen. Dabei binden *RSPO1* und *LGR5* einander mit hoher Affinität. Dagegen ist die Affinität von *RNF43* zu freien *RSPO1* zehnmal niedriger als zu einem *LGR5:RSPO1*-Komplex (Chen *et al.* 2013). Dies spricht für einen molekularen Wettbewerbsmechanismus, bei dem Frizzled und *RSPO1* um die Interaktion mit *RNF43/ZNRF3* konkurrieren (Lau *et al.* 2014). Daraus ergibt sich für *LGR5* ein molekularer Wirkmechanismus, bei dem *LGR5* effizient R-Spondine bindet und diese in Position für eine Interaktion mit *RNF43* bzw. *ZNRF3* bringt. Der *LGR5:RSPO:RNF43* (bzw. *ZNRF3*)-Komplex wird

rasch internalisiert. Dadurch werden die E3-Ligasen (RNF43 bzw. ZNRF3) von der Zelloberfläche entfernt, was wiederum in einer erhöhten Zelloberflächenexpression der Frizzled-Rezeptoren und einer darauf basierenden Verstärkung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals resultiert (Abb. 1.7) (Lau *et al.* 2014).



**Abb. 1.7: Mechanismus der LGR5-RSPO abhängigen Verstärkung des kanonischen Wnt-Signals.** In Abwesenheit von WNT wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und proteosomally abgebaut. Die Bindung des WNT an Frizzled (Fzd) aktiviert den kanonischen Wnt-Signalweg über die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin (s. Kap. 1.4). Die Membranexpression des Frizzled wird über die E3-Ubiquitin-Ligase RNF43/ZNRF3 reguliert, indem diese Frizzled durch Ubiquitinylierung für den Abbau markiert. Die Bindung von RSPO an LGR5 erhöht die Affinität des RSPO an RNF43/ZNRF3 und resultiert in der Ausbildung des LGR5-RSPO-RNF43/ZNRF3 Komplexes, welcher rapide internalisiert wird. Dadurch wird die Zahl der für die Vermittlung des kanonischen Wnt-Signals verantwortlichen Frizzled-Rezeptoren an der Zellmembran erhöht, was in einer Verstärkung des WNT-Signals resultiert. Bild modifiziert nach Liu *et al.* 2012; Koo und Clevers 2014.

Evolutionär reichen die Vorläufer der Komponenten des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges bis zu den Einzellern, während R-Spondin Homologe und die *RNF43*- bzw. *ZNRF3*-Gene erst bei den Deuterostomia (Neumundtiere) zu finden sind. So scheint das R-Spondin-LGR5-RNF43/ZNRF3-Modul erst später in der Evolution zum kanonischen Wnt-Signalweg der Vertebraten hinzugefügt worden zu sein, in welchem es vermutlich für die Feinjustierung der Stärke des WNT-Signals verantwortlich ist (Lau *et al.* 2014). Die LGR4/5/6-Rezeptoren entstanden jedoch in der Evolution bevor R-Spondine angelegt wurden (Barker und Clevers 2010). Dies zeigt, dass die LGR4/5/6-Rezeptoren neben der Verstärkung des kanonischen WNT-Signals alternative Funktionen aufweisen könnten. So wurde gezeigt, dass LGR5 in Abwesenheit von R-Spondinen als ein negativer Regulator des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges fungieren kann, indem es durch Rekrutierung von TROY den WNT:FZD:LRP5/6-Komplex destabilisiert (Fafilek *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2014). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass LGR5 ohne Beteiligung von R-Spondinen den G12/13-Rho-GTPase Signalweg aktivieren kann (Kwon *et al.* 2013). Weiterhin kann der WNT-Agonist Norrin als Ligand für LGR4/5/6

fungieren, jedoch nur über LGR4 den Wnt-Signalweg aktivieren (Deng *et al.* 2013). Des Weiteren weist LGR5 potenzielle Bindestellen für  $\beta$ -Arrestin auf und es konnte gezeigt werden, dass LGR5 nach Überexpression von GRK (G-Protein gekoppelter Rezeptor Kinase)  $\beta$ -Arrestin2 rekrutieren kann (Snyder *et al.* 2013a). Somit häufen sich die Hinweise auf die Existenz weiterer Liganden und/oder Effektoren, welche nach Interaktion mit LGR4/5/6 die klassische Signalvermittlung der GPCR-Rezeptoren wie die Kopplung mit G-Proteinen und  $\beta$ -Arrestin induzieren und so weitere Signaltransduktionswege aktivieren können (Snyder *et al.* 2013a). Im Einklang mit der evolutionären Entwicklung scheint das Wirkspektrum der LGR4/5/6 über die Feinregulation des kanonischen Wnt-Signalweges hinauszureichen.

#### 1.5.4 Klinische Bedeutung

Seit der Identifizierung des LGR5 als Marker adulter Stammzellen des Darmepithels, wurde seine Bedeutung für die Entstehung und Progression von Tumoren sowie als potenzieller Marker für Tumorstammzellen eingehend untersucht. Eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte LGR5 Expression wurde für eine Reihe von Tumorentitäten beschrieben (**Tabelle 1.2**). Zudem wurden in Tumoren bzw. Tumorzelllinien einige Regulationsmechanismen der *LGR5*-Expression aufgezeigt. So wurde häufig eine gesteigerte *LGR5*-Expression im Zusammenhang mit aktivierenden Mutationen in Genen des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg beobachtet (Yamamoto *et al.* 2003; Fan *et al.* 2010). In Lebertumoren ist beispielsweise eine *LGR5*-Überexpression mit Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen und der, daraus resultierenden Deregulierung des Wnt-Signalweges korreliert (Yamamoto *et al.* 2003). Im Kolonkarzinom ist eine hohe *LGR5*-Expression ebenfalls mit einer Deregulierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges assoziiert. Zusätzlich korrelierte eine hohe *LGR5*-Expression mit einer gesteigerten lymphatischen und vaskulären Invasion, dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen und mit einer schlechten Prognose (McClanahan *et al.* 2006; Uchida *et al.* 2010; Fan *et al.* 2010; Takahashi *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012). Darüber hinaus wurde im Mausmodell gezeigt, dass Mutationen im APC-Gen der LGR5-positiven Zellen in den Darmkrypten die Ausbildung von Adenomen induzieren, während Mutationen im APC-Gen der TA-Zellen (*transit amplifying*) in den Darmkrypten eine Adenombildung nicht begünstigt. Dies deutet daraufhin, dass LGR5-positive Kryptenstammzellen potenzielle Ursprungszellen intestinaler Tumoren sind (Barker *et al.* 2009). Auch weitere Arbeiten geben Hinweise auf LGR5 als Tumorstammzellmarker in Darmtumoren (Takahashi *et al.* 2011; Kemper *et al.* 2012). So zeigten aus Kolonkarzinomzelllinien hervorgehende Sphäroide einen – im Vergleich zu adhären wachsenden Zellen – erhöhten Anteil an LGR5-positiven Zellen. Diese LGR5-positiven Zellen wiesen ein höheres klonogenes Potenzial auf als Zellen mit niedriger *LGR5*-Expression (Kemper *et al.* 2012). Weiterhin zeigte sich, dass LGR5 in Kolorektalkarzinomzelllinien zur Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps beiträgt (Hirsch *et al.* 2014). Ferner wurde LGR5 auch mit der Entstehung und Progression anderer Tumorentitäten in Verbindung gebracht. So markiert LGR5 in Haarfollikeln die Stammzellpopulation und wird in daraus entstandenen Tumoren, den BCC (*basal cell carcinoma*), überexprimiert (Tanese *et al.* 2008).

**Tabelle 1.2:** Auflistung der Tumorentitäten, für die eine Einbeziehung von LGR5 in die Tumorentstehung sowie eine Assoziation mit klinischen Parametern beschrieben wurde (Stand 2015).

Tumorart	Status	Studie
Leberkarzinom	Überexpression	(Yamamoto <i>et al.</i> 2003)
Basalzellkarzinom	Überexpression	(Tanese <i>et al.</i> 2008)
Ovarialkarzinom	Überexpression	(McClanahan <i>et al.</i> 2006)
Magenkarzinom	Überexpression	(Yamanoi <i>et al.</i> 2013)
Mammakarzinom	Überexpression	(Yang <i>et al.</i> 2015)
Glioblastom	Überexpression	(Nakata <i>et al.</i> 2013; Wang <i>et al.</i> 2014)
Oesophagus Adenokarzinom	Überexpression	(von Rahden, Burkhard H A <i>et al.</i> 2011; Becker <i>et al.</i> 2010)
Lungen Adenokarzinom	Korrelation mit klinischen Parametern	(Ryuge <i>et al.</i> 2013)
Ewing Sarkom		(Scannell <i>et al.</i> 2013)
Kolonkarzinom	Überexpression, Genvarianten (SNP)	(McClanahan <i>et al.</i> 2006; Uchida <i>et al.</i> 2010; Fan <i>et al.</i> 2010; Wu <i>et al.</i> 2012; Gerger <i>et al.</i> 2011; Kleist <i>et al.</i> 2012)
Mundhöhlenkarzinom	Korrelation mit Rückfallrisiko	(Dalley <i>et al.</i> 2015)
Zervixkarzinom	Überexpression	(Chen <i>et al.</i> 2014a)

In Mammakarzinomen ist LGR5 ein negativer prognostischer Marker und trägt durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges zur Progression und Aufrechterhaltung von stammzellähnlichen Zellen bei (Yang *et al.* 2015; Oskarsson *et al.* 2011). Weiterhin wurde in Sphäroiden von Mammakarzinomzellen eine – im Vergleich zu adhärent wachsenden Zellen – erhöhte LGR5-Expression beobachtet (Oskarsson *et al.* 2011). In Glioblastomen wurde eine erhöhte LGR5-Expression in der CD133+-Tumorstammzell-Fraktion gefunden. Darüber hinaus ist LGR5 auch in Glioblastomen ein negativer prognostischer Marker (Nakata *et al.* 2013). In Magentumoren wurde nach Beendigung der Therapie eine signifikant erhöhte LGR5-Expression in den Tumorzellen festgestellt. Dies lässt auf eine erhöhte Therapieresistenz der LGR5-positiven Magentumorzellen schließen (Bauer *et al.* 2012). Weiterhin resultierte eine TGF- $\beta$ -induzierte EMT (*transforming growth factor beta*) in murinen Magenepithelzellen in der Aktivierung der LGR5-Expression sowie in einer erhöhten Sphäroid- und Koloniebildungstendenz (Voon *et al.* 2013). Dies zeigt, dass LGR5 in die Entstehung und Progression von Tumoren involviert ist und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps in normalen Stammzellen sowie in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten übernimmt.

## 1.6 Zielstellung

Sowohl das Tumorstammzellmodell als auch die Integration der Tumorstammzelltheorie in das klonale Selektion-Modell postuliert die Existenz prädominanter, sich langsam teilender und therapieresistenter Zellen mit einem stammzellähnlichen Phänotyp. Die Existenz solcher Zellen würde ein abgewandeltes therapeutisches Herangehen erfordern, bei dem sich der Therapieansatz nicht nur auf die schnell proliferierenden Zellen begrenzt, sondern auch das Eliminieren solcher prädominanter Tumorzellen zum Ziel hat. Etwa die Hälfte aller Therapieansätze bei verschiedensten

Erkrankungen richtet sich gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor *LGR5* stellt nicht nur einen Marker für adulte Gewebstammzellen und stammzellähnliche Tumorzellen dar, sondern ist auch aktiv in die Tumorentstehung, Tumorprogression und die Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps involviert. Daher steht im Zentrum dieser Arbeit die Beantwortung der Frage, inwiefern sich *LGR5* als *target* in einer zielgerichteten Tumortherapie eignet. Wie sich eine Veränderung (Inhibierung oder Überexpression) der *LGR5*-Expression auf Tumorzellen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund auswirkt, ist noch wenig untersucht.

Deshalb soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich eine Änderung der *LGR5*-Expression auf das zellbiologische Verhalten von Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten auswirkt. Zu diesem Zweck sollen zunächst Kulturen dieser Tumorzelllinien etabliert werden, in welchen die *LGR5*-Expression mittels shRNA herunterreguliert und/oder mittels Expressionsvektoren gesteigert ist. Anschließend soll untersucht werden, wie sich diese Veränderungen der *LGR5*-Expression auf die Proliferation, Koloniebildung, Migration und die Sphäroidbildungsfähigkeit auswirken.

Darüber hinaus sollen mittels des Promotor-Reporter Assays TOPFlash die Effekte einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges der Tumorzellen bestimmt werden.

Weiterhin soll mittels Microarray-Analysen untersucht werden, welche Gene durch *LGR5* reguliert/beeinflusst werden. Anschließend soll eine Verifizierung der identifizierten Kandidatengene auf mRNA-Niveau und Proteinniveau erfolgen. Hierdurch könnten weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von *LGR5* für verschiedene molekulare und zellbiologische Prozesse gewonnen werden.

Ferner soll der Internalisierungsweg des *LGR5*-Proteins und die hierfür notwendigen Bedingungen untersucht werden. Hierbei sollen die Inhibitoren der clathrinvermittelten und der calveolinvermittelten Endozytose eingesetzt werden. Über die Co-Immunfluoreszenzfärbungen des überexprimierten *LGR5* in Kombination mit den Markern für verschiedene Endozytosekompartimente soll der intrazelluläre Transportweg des *LGR5* untersucht werden. In *puls chase*-Experimenten unter definierten Kultivierungsbedingungen (An-/Abwesenheit des Liganden) soll untersucht werden ob und wie bestimmte Faktoren die Internalisierung des *LGR5* beeinflussen.

Abschließend soll die prognostische Bedeutung des tumoralen *LGR5*-mRNA-Gehalts in Weichteilsarkomen und Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien und Patientengut

Tabelle 2.1: Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Lokalisation	Spezies	Risikogruppe	Referenz
<b>MCF-7</b>	Adenokarzinom	Brust	<i>H. sapiens</i>	1	HTB-22 (ATCC)
<b>HaCaT</b>	Normalgewebs-keratinozyten	Haut	<i>H. sapiens</i>	1	(Boukamp <i>et al.</i> 1988)
<b>HT-29</b>	Adenokarzinom	Kolon	<i>H. sapiens</i>	1	HTB-38 (ATCC)
<b>SKLMS-1</b>	Leiomyosarkom	Vulva	<i>H. sapiens</i>	1	HTB-88 (ATCC)
<b>RD</b>	Rhabdomyosarkom	Muskel	<i>H. sapiens</i>	1	CCL-136 (ATCC)
<b>SKBR3</b>	Adenokarzinom	Brust	<i>H. sapiens</i>	1	HTB-30 (ATCC)
<b>SF767</b>	Glioblastom	Gehirn	<i>H. sapiens</i>	1	(Dolan <i>et al.</i> 1990)
<b>HEK293T</b>	Embryonales Nierengewebe	Niere	<i>H. sapiens</i>	1	CRL-3216 (ATCC)

Es wurde Tumormaterial von 77 Weichteilsarkompatienten und 69 Tumorpatienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom untersucht.

Die Weichteilsarkomproben wurden im Zeitraum von 1998-2001 an der Chirurgischen Klinik 1 der Universität Leipzig operiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Begutachtung erfolgte durch Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach der WHO-Klassifikation von 1993. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Tumorproben bzw. Verwendung ihrer klinischen Daten.

Die Tumorproben der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle wurden an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie entnommen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Begutachtung erfolgte an der Pathologie (Eisleben) durch Herrn Dr. med. Udo Bilkenroth. Diese Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung aller Patienten dieser Studie liegt vor.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in der **Tabelle 7.1**, die Oligonukleotide für die Sequenzierung in der **Tabelle 7.2**, die Oligonukleotide für die quantitative SYBR-Green-Echtzeit-PCR in der **Tabelle 7.3** aufgeführt und wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Sonden für die quantitative Taqman-Echtzeit-PCR sind in der **Tabelle 7.4** zusammengestellt und wurden von der Firma ThermoScientific bezogen.

## 2.1.3 Bakterien

Stamm	Genotyp
TOP10	F <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-Lez</i> )7679 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

## 2.1.4 Plasmide

Tabelle 2.2: Plasmide

Plasmid	Ursprungsvektor	Vektortyp	Hersteller	Insert	Quelle
M50 Super 8xTopFlash	pTA-Luc	Expressionsvektor	Clontech	7x TCF/LEF Bindungsseiten; <i>firefly</i> Luziferase	Addgene (#12456)
M51 Super 8xFopFlash	pGL3	Expressionsvektor	Promega	6x Mutierte TCF/LEF Bindungsseiten; <i>firefly</i> Luziferase	Addgene (#12457)
pGL4.74 [hRluc/TK]	pGL4	Expressionsvektor	Promega	<i>renilla</i> Luziferase	Promega
pMD2.G		Expressionsvektor		VSV G	Addgene (#12259)
psPAX2		Expressionsvektor		HIV Variante der Gene <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>rev/tat</i>	Addgene (#12260)
pJet1.2/blunt		Klonierungsvektor	Life Technologies	<i>blunt end</i> PCR Fragmente	Life Technologies
pIRESpuro3 LGR5FL	pIRESpuro3	Expressionsvektor	Clontech	humanes full length LGR5	Carmon et al. 2011
pLVX Puro		lentiviraler Expressionsvektor	Clontech		Clontech
pLVX LGR5FL	pLVX Puro	lentiviraler Expressionsvektor	Clontech	humanes <i>LGR5</i> full length	
pLVX LGR5 $\Delta$ 5	pLVX Puro	lentiviraler Expressionsvektor	Clontech	humanes <i>LGR5<math>\Delta</math>5</i>	
pCR2.1		Klonierungsvektor	Invitrogen		Invitrogen

## 2.1.5 shRNA-Plasmide

Tabelle 2.3: Sequenz der eingesetzten shRNA gegen *LGR5*

Bezeichnung (Sigma)	Sequenz (5'→3')	Position in LGR5FL mRNA	Interne Bezeichnung
TRCN0000011585	CCGCCATCCAGTTTGTGGGAGATCTC GAGATCTCCCAACAAATTGGATGGTTTTT	970-992	
TRCN0000011586	CCGCCATAGCAGTTCTGGCACTTACTC GAGTAAGTGCCAGAACTGCTATGGTTTTT	2008-2030	shRNA1
TRCN0000011587	CCGGCCGTCTGCAATCAGTTACCTACTC GAGTAGGTAAGTATTGCAGACGGTTTTT	1276-1298	
TRCN0000011588	CCGGCTTACATTTATCAGTCCTGAACTC GAGTTCAGGACTGATAAATGTAAGTTTTT	2688-2708	
TRCN0000011589	CCGGGCTCTACTGCAATTTGGACAACTC GAGTTGTCCAAATTGCAGTAGAGCTTTTT	2550-2569	shRNA2

Die gegen *LGR5* gerichtete shRNA-Konstrukte und die entsprechenden Kontrollkonstrukte wurden bei der Firma Sigma Aldrich erworben. Dabei handelt es sich um den lentiviralen Vektor pLKO.1-puro, in den die *small hairpin*-RNAs (shRNAs) gegen *LGR5* bzw. *non targeting*-shRNA kloniert sind. Die shRNAs sind sowohl gegen *LGR5* full length als auch gegen alle bekannten *LGR5* Spleißvarianten ( $\Delta$ 5 und  $\Delta$ 8)

gerichtet. Die vollständigen Sequenzen der shRNAs sind in der Tabelle 2.3 zusammengestellt. Die Klone wurden als Glycerolstock erworben

### 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 2.4: Primärantikörper** (WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz; IHC: Immunhistochemie; MW: Molekulargewicht)

Antigen	MW	Klon	Herkunft	Verdünnung		Hersteller
				WB	IF/ICH	
<b>β-Catenin</b>	92 kDa	D10A8	Kaninchen monoklonal	1:2000	1:200	Cell Signaling
<b>β-Actin</b>	42 kDa	AC-15	Maus monoklonal	1:5000		Sigma Aldrich
<b>CA9</b>	58 kDa	M75	Maus monoklonal	1:2000	1:200	BioScience
<b>E-Cadherin</b>	120 kDa	36/E-Cadherin	Maus monoklonal	1:1000	1:200	BD Laboratories
<b>EEA1</b>	170 kDa	C45B10	Kaninchen monoklonal		1:100	Cell Signaling
<b>HIF-1alpha</b>	120 kDa	54/HIF-1α	Maus monoklonal		1:200	BD Transduction
<b>LAMP1</b>	90-120kDa	D2D11	Kaninchen monoklonal		1:100	Cell Signaling
<b>LGR5</b>	100 kDa		Kaninchen polyklonal	1:500	1:50	Miltenyibiotech
<b>RAB11</b>	25 kDa	D4F5	Kaninchen monoklonal		1:100	Cell Signaling
<b>TGN46</b>	46 kDa		Kaninchen polyclonal		1:100	Novus
<b>Vimentin</b>	57 kDa	D21H3	Kaninchen monoklonal	1:1000	1:100	Cell Signaling
<b>ZO-1</b>	220 kDa	D7D12	Kaninchen monoklonal	1:1000	1:100	Cell Signaling

**Tabelle 2.5: konjugierte Antikörper**

Antigen	Konjugation	Klon	Herkunft	Verdünnung		Hersteller
				WB	IF/ICH	
<b>Kaninchen IgG</b>	IRDye®800		Esel	1:10000		Li-Cor
<b>Maus IgG</b>	IRDye®680		Esel	1:10000		Li-Cor
<b>Kaninchen IgG</b>	Cy3		Esel		1:800	Dianova
<b>Myc Tag</b>	FITC	9B11	Maus monoklonal		1:200	Cell Signaling
<b>Kaninchen IgG</b>	HRP		Ziege polyklonal	1:2000		DakoCytomation
<b>Maus IgG</b>	HRP		Ziege polyklonal	1:2000		DakoCytomation

### 2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden von der Firma Carl Roth bezogen, Zellkulturchemikalien und -lösungen wie RPMI, DMEM, Trypsin, Accutase und FKS wurden

von PAA Laboratories bezogen. Restriktionsenzyme und DNA-Größenstandards wurden von der Firma Fermentas bezogen.

Antibody Diluent	Zytomed Systems
Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (München)
Bolt® LDS-Probenpuffer 4x	Invitrogen (Karlsruhe)
Bolt® MES-Laufpuffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
Bolt® Proben-Reduktionsmittel 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Entwickler	Kodak (Stuttgart)
Filipin	Sigma (Steinheim)
Fixierer	Kodak (Stuttgart)
Monodansylcadaverin (MDS)	Sigma (Steinheim)
NuPAGE 20xMES-Laufpuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® Transferpuffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE LDS-Probenpuffer 4x	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE Proben-Reduktionsmittel 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Pitstop 2™	abcam (Cambridge, UK)
ProLong® Gold antifade reagent	Life Technologies (Darmstadt)
RSPO1 (rekombinant, human)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
ViaFect™ Transfektionsreagenz	Promega (Mannheim)
WNT3A (rekombinant, human)	R&D Systems (Minneapolis, USA)

### 2.1.8 Enzyme und Größenstandards

DNase	Qiagen (Hilden)
HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Biozym (Oldendorf)
T4 Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

### 2.1.9 Kit Systeme

BigDye™ Terminator Sequencing Kit 1.1	Applied Biosystems (Darmstadt)
CloneJET PCR Cloning	Thermo Scientific (Waltham)
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
EMT-Antikörperkit	Cell signaling
Genopure Plasmid Maxi Kit	Roche (Penzberg)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
TA® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)

TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems (Darmstadt)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
ZR Plasmid Miniprep™ - Classic	ZymoResearch (CA, USA)
ZR RNA MiniPrep™ Kit	ZymoResearch (CA, USA)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	ZymoResearch (CA, USA)

### 2.1.10 Geräte und Verbrauchsmittel

Alle Zellkulturmaterialien wie Flaschen, Platten und Pipetten wurden von der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen. Alle Verbrauchs- und PCR-Materialien wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Biozym bezogen.

Blotkammer Mini Trans Blot® Cell	Bio-Rad (München)
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell	Heraeus (Hanau)
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence (Osaka, Japan)
Infrarot-Scanner Odyssey CLx	Li-Cor Biosciences
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare (München)
Polyacrylamid-Gradientengele	Invitrogen (Karlsruhe)
(Bolt® 4-12 % Bis-Tris-Gele); (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gele)	
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Roth (Karlsruhe)
Real-Time-PCR-Cycler Rotorgene™ 6000	Corbett (Wasserburg)
Röntgenfilme	Kodak (Stuttgart)
Zellzählgerät Z1/Z2	Beckman Coulter (Krefeld)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> bzw. 5 % CO<sub>2</sub> (HEK293T) in RPMI- bzw. DMEM- Kulturmedium (HEK293T) mit Zusatz von 10 % FKS und 2 % Antibiotika (185 U/ml Penicillin, 185 µg/ml Streptomycin) als adhärenente Monolayer kultiviert. Zum Passagieren wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS Lösung für ca. 3 min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich die Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens des Kultivierungsmediums/10 % FKS abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 1000 rpm sedimentiert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Konzentration der Zellen wurde mittels des Zellzählgeräts Z2 von Beckman-Coulter bestimmt und die gewünschte Zellzahl in die 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausplattiert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % passagiert.

Zur Kryokonservierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Gefriermedium (40 % Kulturmedium, 40 % FKS und 20 % DMSO) aufgenommen. Je 1,8 ml dieser Suspension wurden auf Gefrieröhrchen verteilt und in Kryobehältern bei  $-80$  °C für 24 h gelagert. Die so kryokonservierten Zellen können über mehrere Wochen bei  $-80$  °C oder zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei  $37$  °C im Wasserbad. Die Zellen wurden nach dem Auftauen im vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen, für fünf Minuten bei 1000 rpm pelettiert und mit 5 ml Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und bei  $37$  °C und 3 % oder 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert

Für die Durchführung des TOPFlash-Assay wurden die Zellen mit Accutase gelöst. Hierbei erfolgt eine schonendere Ablösung der Zellen von Boden der Kulturflasche unter weitgehendem Erhalt von Oberflächenrezeptoren. Nachfolgend wurden die Zellen wie oben beschrieben weiterbehandelt und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl in 96-*well*-Platten ausgesät.

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die Zellen in 24-*well*-Platten, welche Deckgläschen (12 mm  $\emptyset$ ) enthielten, ausgesät. Die Zellzahl betrug je nach Zelllinie zwischen  $5 \times 10^4$  und  $25 \times 10^4$  Zellen/*well*. Nach Bedarf wurden die Deckgläser vor dem Aussäen der Zellen mit Polylysin beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläser in 24-*well*-Platten platziert und mit 300  $\mu\text{l}$  einer 1 mg/ml Polylysinlösung für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Entfernen der Polylysinlösung wurden die *wells* mit FKS-freiem Kulturmedium gespült.

Zur Herstellung von Sphäroid-Kulturen (3D-Kultur) wurden 96-*well*-Platten mit 1,5%iger Agarose, in Kulturmedium (DMEM und RPMI) gelöst, beschichtet. Nachfolgend wurden 3000 bis 7000 Zellen/*well* eingestreut und für vier bis sieben Tage kultiviert. Die Morphologie der Sphäroide wurde am Mikroskop beurteilt und dokumentiert.

#### 2.2.1.2 Lentivirale Transduktion

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurde die Produzentenzelllinie HEK293T mit den jeweiligen lentiviralen Expressionsplasmiden und den Verpackungsplasmiden pMD2.G und psPAX2 Co-transfiziert. Eine Zusammenstellung der verwendeten Plasmide ist in der Tabelle 2.2 dargestellt. Die Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgte mittels der Calciumphosphat-Methode. Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml DMEM-Kulturmedium in Petrischalen (10 cm  $\emptyset$ ) eingestreut. Die zu transfizierenden Vektoren wurden im TE-Puffer (pH 8,0) gelöst (Endkonzentration: 1 mg/ml). Für eine Petrischale (10 cm  $\emptyset$ ) wurden 10  $\mu\text{g}$  des entsprechenden lentiviralen Expressionsvektors mit 5  $\mu\text{g}$  pMD2.G und 10  $\mu\text{g}$  psPAX2 gemischt und in folgender Reihenfolge pipettiert: 0,5 ml steriles gepuffertes Wasser, Plasmide und 0,5 ml 2xHBS. Anschließend wurden 60  $\mu\text{l}$  einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung tröpfchenweise unter ständigem und leichtem Schütteln zugegeben. Die darauf folgende zwanzigminütige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglichte die Ausbildung eines milchigen Präzipitats. Der Transfektionsmix wurde nun tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Zwölf bis 16 Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden

wurden die Viren geerntet. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Zellen vorsichtig abgenommen und fünf Minuten bei 500 g abzentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der virushaltige Überstand kann über mehrere Wochen bei 4 °C oder in Aliquots bei -80 °C eingefroren gelagert werden.

**gepuffertes Wasser (pH 7,3)**

2,5 mM HEPES

Aqua bidest. (Σ 50 ml Volumen)

**2,5 M CaCl<sub>2</sub>**

2,5 M CaCl<sub>2</sub>

Aqua bidest. (Σ 10 ml Volumen)

**2x HBS (pH 7,0)**

0,28 M NaCl

0,05 M HEPES

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Aqua bidest. (Σ 500 ml Volumen)

**TE Puffer pH 8,0 (pH mit HCl)**

10 mM Tris

1 mM EDTA

Alle Lösungen wurden mit einem 0,2µm-Filter steril filtriert.

Zur Infektion wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen je *well* in eine 6-*well*-Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag, nach dem Wechsel des Kulturmediums, wurden die Zellen mit 300 µl virushaltigen Überstand je *well* infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen durch Zugabe von 2 µg/ml Puromycin selektioniert

**2.2.1.3 Internalisierungsassay (*pulse chase*)**

Zur Untersuchung der Internalisierung des überexprimierten LGR5FL- und LGR5Δ5-Proteins wurde die Zelllinie HEK293T herangezogen, da die übrigen in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien, welche das LGR5FL oder LGR5Δ5 überexprimierten, durch die zweistündige Inkubation bei 4 °C stark geschädigt wurden. Die HEK293T Zellen wurden wie in 2.2.1.1 beschrieben auf Polylysin beschichteten Deckgläsern in 24-*well*-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Agonisten des Wnt Signalweges für 16 h oder mit Endozytoseinhibitoren für 30 Minuten behandelt (Kap. 2.2.1.4; 2.2.1.5). Anschließend erfolgte eine Inkubation der vitalen Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-Myc-Tag-Antikörper, welcher gegen das N-terminal am überexprimierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 gekoppelte Myc-Tag gerichtet ist, für 2 Stunden bei 4 °C. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 2.4 und 2.5 zusammengestellt. Im Anschluss wurden die Zellen entweder sofort fixiert (Kap. 2.2.3.3) oder vor der Fixierung mit Agonisten- oder Inhibitoren-haltigem Kulturmedium für eine definierte Zeitspanne im Brutschrank inkubiert. Um vor allem bei kurzen Inkubationszeiten (5 und 15 Minuten) die gleiche Inkubationszeit zu gewährleisten, wurden die Deckgläser nach Antikörperinkubation zunächst in bei 4 °C vorgekühltes Medium überführt und anschließend im Brutschrank für fünf Minuten vorinkubiert. Die Fixierung und Weiterbehandlung der Deckgläser erfolgte wie in 2.2.3.3 beschrieben.

**2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Agonisten des Wnt Signalweges**

Die beiden rekombinanten lyophilisierten Agonisten des kanonischen Wnt-Signalweges WNT3A und RSPO1 wurden nach Angaben des Herstellers in steriler PBS-Lösung mit 0,1 % BSA gelöst und

aliquotiert. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 150 ng/ml WNT3A und/oder 150 ng/ml RSPO1 behandelt. Hierzu wurden die rekombinanten Proteine im Kulturmedium mit Zusatz von 0,1 % FKS entsprechend verdünnt.

#### 2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren der Endozytose

Zur Behandlung der HEK293T-Zellen mit den Inhibitoren MCD (Monodansylcadaverin), Filipin III und Pitstop2™ wurden diese auf mit Polylysin beschichtete Deckgläschen in 24-well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten mit den Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde das sich an der Oberfläche der Zellen befindliche überexprimierte (Myc-Tag) LGR5FL und LGR5Δ5 wie in 2.2.1.3 beschrieben mit einem FITC konjugierten Antikörper markiert und die Zellen für weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor sie fixiert wurden (Kap. 2.2.3.3). Die Inhibierung der clathrinvermittelten Endozytose erfolgte mittels 40 μM MDC (Monodansylcadaverin) sowie 0,03 μM Pitstop2™. Die Inhibierung der calveolinvermittelten Endozytose erfolgte mittels 10 μM Filipin III. Alle Inhibitoren wurden in DMSO entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst und gelagert. Die Inkubation der Inhibitoren erfolgte in DMSO-haltigen Kulturmedium ohne Zusätze (DMSO:Kulturmedium = 1:8). Die Kontrollen wurden mit dem gleichen DMSO-haltigen Kulturmedium inkubiert.

#### 2.2.1.6 Zellkoloniebildungstest

Beim Zellkoloniebildungstest handelt es sich um eine Endpunktmessung. Es wird die Zahl der Zellen ermittelt, die nach einer Behandlung noch teilungsfähig sind und eine Zellkolonie ausbilden können. Der Quotient aus der Zahl der gebildeten Kolonien und der Zahl eingestreuter Zellen ergibt die absolute Plattiereffizienz. Der Quotient aus den absoluten Plattiereffizienzen der behandelten Probe und der Kontrolle ergibt die relative Plattiereffizienz, die eine Aussage über den Einfluss der jeweiligen Behandlung auf das Langzeitüberleben der Zellen erlaubt.

- absolute Plattiereffizienz =  $\frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{eingestreute Zellzahl}}$
- relative Plattiereffizienz =  $\frac{\text{absolute Plattiereffizienz (Behandlung)}}{\text{absolute Plattiereffizienz (Kontrolle)}}$

Nach Behandlung wurden die konfluent wachsenden Zellen durch Trypsin-Behandlung vom Kulturflaschenboden abgelöst und fünf Minuten bei 1000 rpm sedimentiert. Das dabei erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden nun definiert (300–1000 Zellen in Abhängigkeit von der Zelllinie) in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen eingestreut und bei 37 °C kultiviert. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Zellen mit 3,7%iger Formalin-Lösung für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellkolonien einmal mit Aqua dest. gewaschen und mit einer 20%igen Giemsa-Lösung für acht bis zehn Minuten angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua

dest. wurden die Zellen luftgetrocknet. Die sichtbaren blauen Zellkolonien (ca. 50 Zellen je Kolonie) wurden makroskopisch ausgezählt. Die so erhaltenen Koloniezahlen wurden zur Ermittlung der Plattiereffizienz herangezogen.

#### 2.2.1.7 Wundheilungsassay (*scratch assay*)

Eine Möglichkeit, den Einfluss einer Behandlung auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, stellt der sogenannte Wundheilungsassay dar (Hintermann *et al.* 2001; Koivisto *et al.* 2006), bei welchem verfolgt und dokumentiert wird, wie schnell die Zellen in einen *scratch* (Wunde) im Zellrasen in einer 2D-Kultur einwandern. Hierfür wurden in eine 24-*well*-Platte  $2-5 \times 10^5$  Zellen je *well* ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde mithilfe einer 200- $\mu$ l-Pipettenspitze eine kreuzförmige Wunde durch den konfluenten Zellrasen gezogen (*scratch*). Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die *wells* vorsichtig mit PBS gewaschen, um die abgelösten Zellen zu entfernen und neues Kulturmedium zugegeben. Die Wunden wurden sofort sowie nach 16 Stunden an exakt derselben Stelle fotografiert, um das Voranschreiten des Wundverschlusses zu dokumentieren. Der Test wurde als unabhängiger Dreifachversuch mit jeweils einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die grafische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ* und der Erweiterung *MiToBo* (*Scratch Assay Analyser*). Es wurde die Fläche des *scratches* zum Startpunkt (0 h) und nach 16 Stunden (16 h) ausgemessen. Die Strecke, welche die Zellen in 16 h zurückgelegt haben, wurde mit dem Startpunkt (0 h) verglichen und die Kontrollen auf 100 % gesetzt.

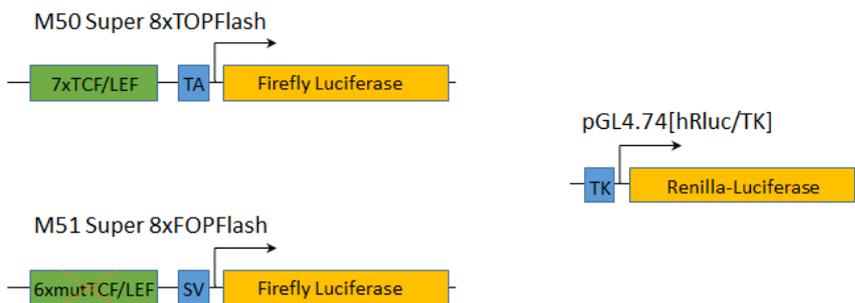
#### 2.2.1.8 Bestimmung des Zellwachstums mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay

Der SRB-Assay kann herangezogen werden, um den Einfluss einer Behandlung auf das Zellwachstum zu bestimmen. Das Prinzip des Assays basiert auf der Anfärbung des Proteins durch den anionischen Farbstoff Sulforhodamin B (Skehan *et al.* 1990). Dieser bindet unter mild sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine. Durch die Verschiebung des pH-Wertes ins Basische (pH 10) kann der gebundene Farbstoff in Lösung gebracht werden und dessen Intensität fotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Dabei korreliert die gemessene Absorption mit der Zellzahl. Hierzu wurden 1000 bzw. 1500 Zellen je *well* in eine 96-*well*-Platte eingestreut und vier Tage im Brutschrank inkubiert. Am fünften Inkubationstag wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen mit 200  $\mu$ l eiskalter 10 % Trichloressigsäure (TCA) für eine Stunde bei 4 °C fixiert. Anschließend erfolgten fünf Waschschrte mit Eiswasser. Die Platten wurden trocken geklopft und die Zellen mit 100  $\mu$ l 0,4%iger SRB-Lösung (in 1 % Essigsäure) für zehn Minuten bei RT gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 1 % Essigsäure ausgewaschen und die Platten an der Luft über Nacht getrocknet. Nachfolgend wurde der gebundene Farbstoff durch Zugabe von 300  $\mu$ l 20 mM Tris pH 10 und 30 min Schütteln in Lösung gebracht und die Absorption bei 540 nm mittels Plattenreader (GENios von Tecan) bestimmt.

#### 2.2.1.9 TOPFlash-Assay

Bei dem TOPFlash-Assay handelt es sich um einen Promotor-Reporter Assay (Veeman *et al.* 2003b). Ein Promotor-Reporter Assay ermöglicht es, die Aktivität eines Transkriptionsfaktors zu quantifizieren,

indem seine transkriptionelle Wirkung auf einen Promotor mit nachgeschaltetem Reporter (Luciferase Gen) anhand der resultierenden Lichtemission gemessen wird. Der TOPFlash-Assay erlaubt eine quantitative Aussage über den Einfluss von Faktoren auf die Aktivität des kanonischen ( $\beta$ -Catenin abhängigen) Wnt-Signaltransduktionsweges. Das Prinzip des Assays beruht auf der sequenziellen bioluminometrischen Erfassung der Aktivitäten zweier unterschiedlicher Luciferasen (*firefly* und *renilla*) nacheinander. Dabei dient das *firefly* Luciferase Gen als Reporter. Es steht unter der Kontrolle eines Minimalpromotors und vorgeschalteter sieben intakter (TOPFlash) oder mutierter (FOPFlash) Promotorbindestelle für den Transkriptionsfaktor TCF/LEF, welcher nach Interaktion mit  $\beta$ -Catenin aktiviert wird (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der im TOPFlash-Assay verwendeten Plasmidkonstrukte.** Im TOPFlash-Vektor steht das *firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines Minimal-TA-Promotors, (TATA Box des Herpes Simples Virus Thymidinkinase Promotor), welchem sieben native (TOPFlash) Bindungselemente vorgeschaltet sind. Im FOPFlash Vektor steht das *firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors (SV), welchem sechs mutierte (FOPFlash) TCF/LEF-Bindungselemente vorgeschaltet sind. Im pGL4.74[hRluc/TK], welcher zum *background*-Abgleich herangezogen wird, steht das *renilla*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines Minimal Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-Promotors (TK).

Eine erhöhte Aktivierung des Wnt-Signalweges führt zu einer verstärkten Stabilisierung des zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin und damit zu einer erhöhten Expression des über die TCF/LEF-Promotorbindestellen induzierbaren Reporters (*firefly* Luciferase), was eine erhöhte Biolumineszenz zur Folge hat. Im FOPFlash-Vektor kann die  $\beta$ -Catenin abhängige Transkription des *firefly* Luciferase Gens aufgrund der mutierten TCF/LEF-Bindestellen nicht erfolgen, sodass dieser als Kontrolle dient. Eine weitere Luciferase (*renilla*), welche unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Minimalpromotors steht, dient als interne Kontrolle und wird zur Normalisierung der Messwerte herangezogen. Da die beiden Luciferasen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, kann deren Aktivität in aufeinanderfolgenden Messungen in nur einem Reaktionsansatz bestimmt werden. Eine Zusammenstellung der Vektoren ist in der Tabelle 2.2 zu finden. Zur Durchführung des Assays wurden mit Accutase-Lösung gelöste Zellen in zuvor optimierter Zellzahl in 96-*well*-Platten eingestreut. Die 96-*well*-Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einem der beiden *firefly*-Luciferase-Vektoren TOPFlash bzw. FOPFlash und dem *renilla*-Luciferase-Vektor pGL7.74 mittels Viafect™ Transfektionsreagenz (Promega) in einem Verhältnis 10:1 (*firefly* Luciferase Vektor : *renilla* Luciferase Vektor) transient co-transfiziert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium auf den Zellen gegen 90  $\mu$ l/*well* frisches Kulturmedium ausgetauscht. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Transfektionsmix je *well* hinzugefügt. Der Transfektionsmix

wurde wie in Tabelle 2.6 zusammengefasst, pipettiert, gründlich gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für weitere acht Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tabelle 2.6: Transfektionsmix TOPFlash-Assay**

1xTransfektionsmix	Volumen/10 µl [µl]
90 ng TOPFlash bzw. FOPFlash Vektor	x
10 ng hRluc Vektor	y
RPMI-Medium (FKS-frei)	Add 10
ViaFect™ Transfektionsreagenz	0,4

Anschließend wurde der Transfektionsmix entfernt und durch frisches Kulturmedium (0,1 % FKS) mit 150 ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1 bzw. einer Kombination der beiden (150 ng/ml WNT3A und 150 ng/ml RSPO1) ersetzt. Die Luciferase-Aktivität wurde 16 Stunden nach Stimulation mittels des Dual-Glo Luciferase-Assay (Dual-Glo® Luciferase Assay System von Promega) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung erfolgte am Plattenreader (GENios von Tecan). Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, wobei jede Probe jeweils als Triplet mitgeführt wurde. Zur Normalisierung der TOPFlash- bzw. FOPFlash-*firefly*-Luciferase-Messwerte wurden diese durch die entsprechenden *renilla*-Luciferase-Messwerte geteilt. Außerdem wurde das Verhältnis [TOP normalisiert/FOP normalisiert] gebildet, was im Weiteren als *ratio* bezeichnet wird. Wird der *ratio* der Behandlung zum *ratio* der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt, so ergibt dies den sogenannten *fold change*, welcher die Änderung der Wnt-Aktivität in Abhängigkeit von der Behandlung aufzeigt. Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratio* (Stimulation)/*ratio* (nicht-stimulierte Kontrolle) und zeigt an, wie sich die Wnt-Aktivität in Abhängigkeit von der Stimulation mit Agonisten verändert. Der *fold change* (*LGR5* Modulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratio* (Reduktion der *LGR5* Expression bzw. *LGR5FL* oder *LGR5Δ5* Überexpression)/*ratio* (shRNA Kontrolle shKtr bzw. Leervektorkontrolle LVKtr) und zeigt, wie sich die veränderte *LGR5*-Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges auswirkt.

$$\text{TOP (FOP)normalisiert} = \frac{\text{TOP (FOP) firefly}}{\text{TOP (FOP) renilla}}$$

$$\text{ratio} = \frac{\text{TOP normalisiert}}{\text{FOP normalisiert}}$$

$$\text{fold change} = \frac{\text{ratio (Behandlung)}}{\text{ratio (unbehandelte Kontrolle)}}$$

## 2.2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die grundlegenden molekularbiologischen Methoden wie Agarosegelelektrophorese und Ethanol-fällung wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgte mittels Spektrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific (Waltham, USA)). Enzymatische Reaktionen wie Restriktionsverdau und Ligation erfolgten nach Angaben des Herstellers unter der Verwendung entsprechender Enzyme und Puffer. Bei Verwendung von Kit-Systemen wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte unter Verwendung des ZymoResearch RNA Miniprep Kit. Die Isolation geringer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte durch den ZR Plasmid Miniprep™ Classic Kit (Zymo Research), große Plasmid-DNA-Mengen wurden mittels PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) isoliert. Die Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mittels des Zymoclean Gel DNA Recovery Kits von Zymo Research. Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde der pCR2.1-Vektor aus dem TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die Klonierung von PCR-Produkten, welche mittels der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase hergestellt wurden, erfolgte anhand des CloneJET PCR Cloning Kit der Firma ThermoScientific. Die Sequenzierung wurde durch die Firma SeqLab durchgeführt. Die Untersuchung bzw. Abgleich der erhaltenen DNA-Sequenzen erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Clonemanager und der NCBI Datenbank.

### 2.2.2.2 Mikrobiologische Standardmethoden

Allgemeine mikrobiologische Methoden wurden anhand von Standardprotokollen durchgeführt. Die Anzucht der *E. coli* erfolgte im LB-Medium oder auf LB-Agar Platten. LB-Medium und LB-Agar wurde von der Firma Sigma bezogen. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde das LB-Medium bzw. LB-Agar mit 150 µg/ml Ampicillin supplementiert. Chemokompetente TOP10 *E. coli* wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Transformation durch Hitzeschock erfolgte nach Angaben des Herstellers. Sämtliche mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Arbeitsgeräte und Materialien wurden autoklaviert oder gegebenenfalls steril filtriert.

### 2.2.2.3 Isolation der Gesamt-RNA mittels TRIZOL

Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS-Lösung gewaschen und durch Zugabe von TRIZOL direkt in der Flasche lysiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Es wurde 1 ml TRIZOL pro eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche verwendet. Das Zelllysate wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform 15 Sekunden ausgeschüttelt und drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 2 °C wurde die wässrige obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol für eine Stunde bei -20 °C. Anschließend wurde die RNA für 15 Minuten bei 13000 rpm und 2 °C pelletiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die RNA wurde in 50 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert. Zur Isolation von Gesamt RNA aus Tumormaterial wurden von den kryokonservierten Tumorproben am Kryocut 20 µm dicke

Schnitte angefertigt. Bis zu 15 solcher Schnitte wurden mit 500 µl TRIZOL versetzt. Die weiteren RNA-Isolationsschritte erfolgten wie oben beschrieben.

#### 2.2.2.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird mRNA mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und *random hexamer*-Primern oder Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktion wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl *random hexamer*-Primern oder Oligo-dT-Primern in 12 µl Gesamtvolumen gemischt, fünf Minuten bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x Puffer, 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) und 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Die Reaktion wurde 25 Minuten bei 25 °C und anschließend 1 h bei 42 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 2.2.2.5.1 Polymerase -Kettenreaktion mittels der taq-Polymerase

In dieser Arbeit erfolgte die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente mit dem *HotStartTaq* DNA-Polymerase-Kits (Qiagen, Hilden). Standardmäßig wurden als *template* 20 ng cDNA eingesetzt. Die Komponenten eines 25 µl-Ansatzes sind in Tabelle 2.7 und das PCR-Programm in der Tabelle 2.8 dargestellt. Die Primer sind der Tabelle 7.1 zusammengestellt.

**Tabelle 2.7: Reaktionsmix für die PCR mit der taq-Polymerase**

Komponenten	Volumen/25 µl Reaktion [µl]	Endkonzentration
Q-Solution	5	1x
10x Reaktion Buffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2	2 mM
10 mM dNTP Mix	0,5	je 0,2 mM
20 µM forward primer	0,25	0,2 µM
20 µM reverse primer	0,25	0,2 µM
HotStarTaq (5U/µl)	0,1	0,02 U/µl
Template cDNA	1	
Nuklease-freies Wasser	Add 25	

**Tabelle 2.8: PCR-Programm im Thermocycler für die PCR mittels taq-Polymerase**

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	} 30-40x
Anneling	55°C-65°C*	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Hold	4°C	∞	

\* Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaars.

### 2.2.2.5.2 *high-fidelity* Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation der kompletten kodierenden Sequenzen erfolgte mittels der *high fidelity*-DNA-Polymerase. Während die *taq*-Polymerasen aufgrund der fehlenden *proof reading*-Funktion hohe Fehlerraten bei der DNA-Synthese aufweisen, besitzen die *high fidelity*-Polymerasen eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, welche es erlaubt, falsch eingebaute Basen wieder zu entfernen. In dieser Arbeit wurde die Amplifikation der kodierenden Sequenz von LGR5 mit der *Phusion High Fidelity* DNA-Polymerase (Biozym) durchgeführt. Bei einer *nested*-PCR handelt es sich um eine Methode zur Steigerung der PCR-Produkt-Menge. Dabei werden zwei PCRs hintereinander ausgeführt. Das PCR-Produkt aus der ersten PCR wird als *template* für die zweite PCR verwendet. Das Primerpaar für die zweite PCR-Reaktion bindet *downstream* des Primerpaars der ersten PCR-Reaktion, also weiter innen im zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Die Komponenten eines 20 µl-Ansatzes sind in Tabelle 2.9 und das PCR Programm in der Tabelle 2.10 dargestellt. In der Reaktion wurde als *template* ausschließlich cDNA eingesetzt, welche mit Oligo-dT-Primern hergestellt wurde. Die für die Amplifikation eingesetzten Primer sind in der Tabelle 7.1 zusammengestellt.

**Tabelle 2.9: Reaktionsmix für die PCR mit der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase**

Komponenten	Volumen/20 µl Reaktion [µl]	Endkonzentration
5xPhusio Green HF Buffer	4	1x
10 mM dNTPs	0,4	200 µM
20 µM forward primer	0,5	0,5 µM
20 µM reverse primer	0,5	0,5 µM
Template DNA	1	
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	0,2	0,02 U/µl
Nuklease freies Wasser	Add 20	

**Tabelle 2.10: PCR-Programm im Thermocycler für die PCR mittels der Phusion High Fidelity DNA Polymerase**

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 sek	1
Denaturierung	95°C	10 s	} 25-35x
Anneling	55°C-65°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Terminale Elongation	72°C	10 min	1

\* Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaars.

### 2.2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Mittels der quantitativen Echtzeit-PCR (*real-time quantitative* PCR; qPCR) kann die Menge einer spezifischen cDNA quantifiziert werden. Es gibt zwei Technologien zur Durchführung der qPCR: die SYBR® Green I-Technologie und die Taqman-Sonden-Anwendung. Beide Technologien beruhen auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), bieten jedoch die Möglichkeit, die gebildete PCR-Produktmenge während des gesamten Reaktionsverlaufs anhand einer fluoreszenzbasierenden Messung zu verfolgen. Die Höhe des gemessenen Fluoreszenzsignals ist proportional zur entstandenen Menge des PCR-Produktes. Unter Berücksichtigung der Reaktionszyklen können daraus Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte gezogen werden. Die aufgezeichnete

Fluoreszenzmenge wird in einem Amplifikationsplot über der Zykluszahl aufgetragen. Der Schwellenwert *threshold* wird als die Fluoreszenzintensität definiert, die innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Die Zellzyklusnummer, bei der dieser Schwellenwert in den einzelnen Reaktionsansätzen erreicht wird, wird als Ct-Wert bezeichnet. Der Ct-Wert ist für jede einzelne Probe charakteristisch und dient als Grundlage für die weitere Quantifizierung. Die Quantifizierung kann absolut oder relativ erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung werden den erhaltenen Ct-Werten der Proben anhand eines mitgeführten internen Standards Konzentrationen zugeordnet. Bei der relativen Quantifizierung werden die erhaltenen Ct-Werte der Proben zu den Ct-Werten von Referenzgenen (*house keeping* Gene) in Relation gesetzt und anschließend analysiert.

Die quantitative Taqman-Echtzeit-PCR-Reaktion (Taqman-qPCR) wurde mittels TaqMan Gene Expression Assay durchgeführt. Eine Zusammenstellung der eingesetzten Taqman-Sonden befindet sich in der Tabelle 7.4. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in der Tabelle 2.11 und das entsprechende PCR-Programm in der Tabelle 2.12 aufgeführt. Als Referenzgen wurde hier *RPII* (RNA Polymerase II) verwendet. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta Ct$ -Methode, wobei die via PCR gemessenen Ct-Werte analysiert und nachfolgend linearisiert wurden. Anschließend wurde das arithmetische Mittel aus den Messwerten der Dreifachversuche gebildet.

**Tabelle 2.11: Reaktionsmix für die qPCR mittels TaqMan Gene Expression Assay**

Komponenten	Volumen/10 $\mu$ l Reaktion [ $\mu$ l]	Endkonzentration
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	5	1x
20x TaqMan Expression Assay	0,5	1x
Template cDNA	1	
Nuklease freies Wasser	Add 10	

**Tabelle 2.12: PCR Programm im Rotorgene™ 6000 für die qPCR mittels TaqMan Gene Expression Assay**

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	} 40x
Anneling	60°C	60 s	

Die Bestimmung des *LGR5 full length*- und *LGR5 $\Delta$ 5*-mRNA-Gehalts in Patientenproben erfolgte durch die Firma Roboscreen mit der für diese Zwecke in der Firma etablierten Taqman-qPCR.

Die quantitative SYBR-Green-Echtzeit-PCR-Reaktion (SYBR-Green-qPCR) wurde mittels des Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) von Thermo scientific durchgeführt. Eine Zusammenstellung der in dieser Reaktion verwendeten Primer befindet sich in der Tabelle 7.3. Der Reaktionsansatz wurde, wie in der Tabelle 2.13 zusammengestellt, pipettiert. Die PCR erfolgte im real time PCR Cycler Rotorgene™ 6000 von Corbett nach dem Programm in der Tabelle 2.14. Als Referenzgen wurde hier *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) verwendet.

Tabelle 2.13: Reaktionsmix für die SYBR-Green-qPCR

Komponenten	Volumen/15 $\mu$ l Reaktion [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	7,5	1x
20 $\mu$ M forward Primer	0,25	0,3 $\mu$ M
20 $\mu$ M reverse Primer	0,25	0,3 $\mu$ M
Template DNA	1	
Nuklease freies Wasser	Add 15	

Tabelle 2.14: PCR Programm im Rotorgene™ 6000 für die SYBR-Green-qPCR

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	} 40x
Anneling	55°C-65°C*	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Schmelzkurvenanalyse	72°C - 95°C	Anstieg 2 °C/30 s	

\* Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaars Tabelle 2.6).

#### 2.2.2.7 Konstruktion LGR5 und LGR5 $\Delta$ 5 überexprimierender Vektoren

Der *LGR5 full length* Expressionsvektor pIRESpuro3LGR5FL (LGR5FL) wurde von der AG Qingyun Liu (Carmon *et al.* 2011) zur Verfügung gestellt. Hier wurde die *LGR5 full length* kodierende Sequenz mit N-terminal gekoppeltem Myc-Tag (der Signalpeptidsequenz vorgeschaltet) mittels den EcoRI- und NotI-Restriktionsschnittstellen in den pIRESpuro3-Vektor (Firma Clontech) kloniert. Der lentivirale LGR5FL-Expressionsvektor wurde hergestellt, indem die Sequenz für das Myc-Tag gekoppelte LGR5FL mithilfe von AfeI- (Eco47III) und NotI-Restriktionsschnittstellen aus dem pIRESpuro3LGR5FL herausgeschnitten und in den lentiviralen Expressionsvektor pLVX-puro (Firma Clontech) unter Erhalt der Restriktionsschnittstellen kloniert wurde. Da sich in dem pIRESpuro3LGR5FL-Vektor eine NotI-Restriktionsschnittstelle sowohl am Ende der LGR5FL-Sequenz als auch zwischen Signalpeptidsequenz und Myc-Tag befand, wurde in zwei Schritten (AfeI-NotI und anschließend NotI-NotI) kloniert. Die Konstruktion eines LGR5 $\Delta$ 5 lentiviralen Expressionsvektors erfolgte wie folgt. Die codierende Sequenz wurde mittels einer Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (Biozym) und der Oligonukleotide LGR5 full 207fw und LGR5 full 3137rw aus der cDNA der HEK293T, welche unter Verwendung von Oligo-dT-Oligonukleotide hergestellt wurde, amplifiziert und in den pJET1.2/*blunt* kloniert. Anschließend wurde an die kodierende LGR5 $\Delta$ 5 Sequenz (hinter die Signalpeptidsequenz) N-terminal eine NotI-Schnittstelle und ein Myc-Tag und C-terminal eine NotI-Schnittstelle in einer PCR-Reaktion angefügt. Als *template* diente der LGR5 $\Delta$ 5 pJet1.2/*blunt* Klonierungsvektor, wobei in der PCR-Reaktion die Oligonukleotide  $\Delta$ 5 N-NotI-Myc und  $\Delta$ 5 C-NotI und die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase verwendet wurden. Das Produkt wurde über die NotI-Schnittstellen in den lentiviralen Expressionsvektor pLVX-LGR5FL unter Erhalt der Schnittstellen kloniert, wobei das LGR5FL gegen LGR5 $\Delta$ 5 ausgetauscht wurde. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung verifiziert. Die Sequenzen der für die Klonierung verwendeten Primer sind in der Tabelle 7.1 die Sequenzierprimer in der Tabelle 7.2 zusammengefasst.

### 2.2.2.8 DNA-Mikroarray-Analysen

Für die DNA-Mikroarray-Analysen wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA durch TRIZOL isoliert und wie folgt aufgereinigt. Zu 10 µl Gesamt-RNA wurden 5 µl 7,5 M Ammoniumacetat, 25 µl 96%iges eiskaltes Ethanol und 0,5 µl Glyco-Blue (Ambion) zugegeben, gut gemischt und für mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert. Die RNA wurde dann für 20 Minuten bei 13000 rpm und 2 °C pelletiert und mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl RNase/DNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Mikroarray-Analysen wurden durch die *Microarray Core Facility* des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Leipzig (Medizinische Fakultät der Universität Leipzig) durchgeführt. Die Analyse erfolgte auf den Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips. Die Daten repräsentieren ca. 46 000 Transkripte und decken das vollständige menschliche Genom ab. Die Daten wurden durch Dr. Krohn des IZKF Leipzig vorausgewertet.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinisolierung aus Zellkulturen und Konzentrationsbestimmung

Konfluent wachsende Zellen wurden einmal mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen. Nach gründlichem Absaugen der PBS-Lösung erfolgte die Zugabe von 40-60 µl Lysereagenz. Die Lyse der Zellen erfolgte für ca. 10 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die lysierten Zellen von den Petrischalen abgeschabt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für zehn Minuten bei 15000 rpm und 4 °C entfernt. Die so gewonnenen Zelllysate wurden aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Konzentration der löslichen Proteine in den Lysaten wurde mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kit entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt.

#### **Lysereagenz**

10 mM HEPES

150 mM NaCl

1 mM EDTA

2 % SDS

#### **frisch zugeben**

100 mM NaF

100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1:100 Protease-Inhibitor

### 2.2.3.2 Western Blot-Analyse

#### 2.2.3.2.1 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 4–12%igen Bis-Tris-Mini-Gelen (Invitrogen). Dafür wurden 25-60 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Dazu wurde das entsprechende

Volumen Proteinlysats mit 6 µl 4x LDS-Probenbuffer (Invitrogen), 2 µl 10x Proben-Reduktionsmittel (Invitrogen) gemischt und mit Wasser auf 24 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben zehn Minuten bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1xMES bzw. 1xMOPS Buffer (20xStammlösung, Invitrogen). Die Auftrennung erfolgte in XCell SureLock™ Gelkammer (Invitrogen) ca. 90 Minuten bei 170 V im Kühlschrank. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*) mitgeführt.

#### 2.2.3.2.2 Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden durch die Tank-Blot-Methode im XCell II™ Blot Module (Invitrogen) aus dem Gel auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) oder bei Immundetektion am Licor-Imager auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Filterpapier, Schwämme und die Membran (PVDF Membran in Methanol aktiviert) wurden ca. 30 Minuten vor dem Transfer im Transferpuffer (1xTransferbuffer (20xStammlösung, Invitrogen) und 10 % Methanol) inkubiert. Nach dem Abtrennen der Geltaschen wurde die Blotapparatur nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 300 mA bei 4 °C im Kühlschrank.

#### 2.2.3.2.3 Immundetektion

In der Immundetektion konnten nun spezifische Proteine auf der Membran nachgewiesen werden. In dieser Arbeit erfolgt die Immundetektion über zwei Methoden, zum einen durch Chemolumineszenz und zum anderen durch Fluoreszenz. Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte in der Dunkelkammer über Röntgenfilme, die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am Licor-Imager (AG. Hüttelmaier). Zur Detektion der auf die Membran geblotteten Proteine wurde ein gegen das untersuchte Protein gerichteter Primärantikörper verwendet (Tabelle 2.8). Nachfolgend wurde ein Sekundärantikörper eingesetzt, welcher den Primärantikörper erkannte und entweder mit der Meerrettich-Peroxidase oder einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war (Tabelle 2.9). Zur Durchführung der Immundetektion wurde die Membran nach dem Transfer kurz in TBST Lösung (1xTBS; 0,1 % Tween20) gewaschen und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Sollte die Immundetektion am Licor erfolgen, so wurde anstatt von TBST-Lösung PBST-Lösung (1xPBS; 0,1 % Tween20) verwendet. Alle Waschschrte erfolgten in einem 50 ml-Reaktionsgefäß auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde bei RT in Milchlösung (10 % Magermilchpulver aufgelöst in TBST/PBST-Lösung) inkubiert und anschließend kurz in TBST/PBST-Lösung gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (in entsprechender Verdünnung in Milchlösung) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils zehn Minuten in TBST/PBST-Lösung wurde der entsprechend konjugierte Sekundärantikörper (entsprechend verdünnt in Milchlösung) aufgebracht und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für jeweils zehn Minuten mit TBST/PBST-Lösung und einmal zehn Minuten mit 1xTBS Lösung oder 30 Minuten in 1xPBS-Lösung (Licor) gespült. Die Detektion des mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers erfolgte unter Verwendung von ECL *Western-Blotting-Detection-System*

(Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Der Umsatz des Substrats (ECL) durch die Peroxidase setzt Chemolumineszenz frei. Diese Lumineszenz wurde durch Auflegen eines Kodak® Biomax MR Röntgenfilms in der Dunkelkammer detektiert. Anschließend wurden die Filme entwickelt. Die Detektion des Fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörpers erfolgte am Odyssey CLx *Western Blot Detection System* von Licor Biosciences (AG Hüttelmaier) MLU Medizinische Fakultät Halle.

**10x TBS (pH 7,4)**

1,5 M NaCl

0,5 M Tris(*base*)

Aqua bidest. (Σ 1000 ml)

**10x PBS (pH 7,4)**

4 M NaCl

26 mM KCl

15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Aqua bidest. (Σ 1000 ml Volumen)

**2.2.3.3 Immunfluoreszenz auf Deckgläschen**

Die Zellen wurden in 24 *well*-Platten auf 12 mm-Deckgläschen kultiviert (Kap. 2.2.1), welche zuvor mit 40 % HCL/60 % EtOH (96 %) angeätzt oder mit Polylysin beschichtet wurden (Kap. 2.2.1). Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 4 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS (Sigma Aldrich) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in 1xPBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für eine Stunde mit *antibody diluent* bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung im *antibody diluent*. Die Antikörperinkubationen wurden im Tropfen (25 µl Antikörperlösung) auf einem Paraffinfilmm in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen – nach dreimaligem Spülen mit PBS-Lösung – mit dem entsprechenden fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde im Tropfen inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte für fünf Minuten mittels DAPI-Lösung. Daran schlossen sich drei Waschschrte mit PBS-Lösung an, bevor die Deckgläser 1x in Aqua bidest. und 1x in 96%igem Ethanol gewaschen wurden. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die Deckgläser auf Objektträger mithilfe des ProLong® Gold antifade reagent (Life Technologies) eingebettet. Die Analyse erfolgte am Keyence BZ-8000 Mikroskop ((Biozero)(KIMIV UKH)).

**2.2.3.4 Immunhistologische Untersuchung der Sphäroide**

Die Sphäroide wurden aus der 96 *well*-Platte entnommen bei 500 für fünf Minuten sedimentiert und anschließend in 4 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Bis zur weiteren Behandlung wurden die Sphäroide bei 4° C gelagert. Die Einbettung der Sphäroide in Paraffin erfolgte als TMA (*tissue microarray*). Bei dem TMA handelt es sich um ein Verfahren, bei dem ausgestanzte Gewebezylinder unterschiedlicher Herkunft auf einem Paraffinblock zusammengesetzt werden. Auf diese Weise können bis zu 100 Proben auf einem Block untergebracht und gleichzeitig mittels Immunhistologie untersucht werden. Dieses TMA-Verfahren und die Herstellung der Paraffinschnitte der Sphäroide sowie die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) wurden durch Herrn Rudolf

Jung (Universität Regensburg) durchgeführt. Die Immunhistochemische Färbungen der Paraffinschnitte mit Antikörpern gegen LGR5, ZO-1,  $\beta$ -Catenin, E-Cadherin, Vimentin, CA9 und HIF-1alpha erfolgte im Institut für Pathologie der MLU, Medizinische Fakultät, durch Frau Beer.

#### 2.2.4 Statistische Analysen

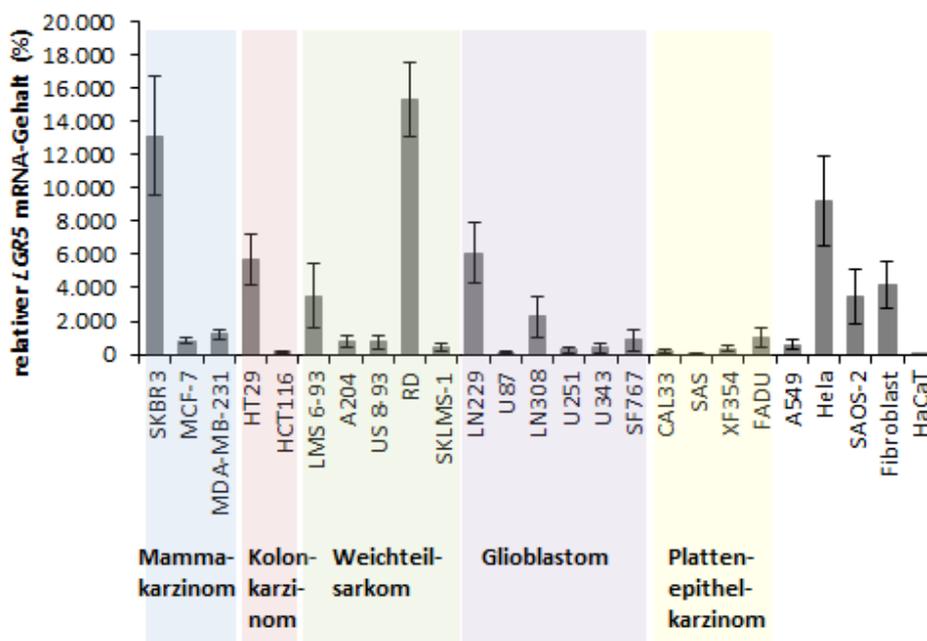
Die statistische Auswertung der *in vitro* Daten (Wachstum, Migration, Genexpression) erfolgte mit Microsoft Excel 2010. Hierbei wurde der zweiseitige ungepaarte Student's T-Test angewendet. Ein Ereignis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$  ( $p \leq 0,05$ ) wurde als signifikant betrachtet. Für die bessere Übersichtlichkeit der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der Kontrollen in den jeweiligen Versuchen auf 100 % gesetzt und die Mittelwerte der Behandlungen auf die zugehörige Kontrolle bezogen. Die Versuchsergebnisse sind dann als prozentualer Anteil im Vergleich zur Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Signifikante Differenzen sind im Text erwähnt und in den Abbildungen gekennzeichnet. Für die Durchführung der T-Tests wurden die absoluten Werte (Rohdaten oder gegebenenfalls normalisierte Daten) herangezogen.

Die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte mit der Software SPSS Statistics 22 von IBM (New York, USA). Die statistischen Analysen umfassten Überlebensanalysen (Kaplan-Meier-Analysen, uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen), Korrelationsanalysen (nichtparametrische bivariate Korrelation nach Spearman) und  $\chi^2$  Teste (Kreuztabellen). Als signifikant wurden in allen Analysen die Werte bezeichnet die innerhalb des Konfidenzintervalls von 95 % lagen oder deren p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) im Hypothesentest das Signifikanzniveau von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) nicht überschritt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 *LGR5*-mRNA-Gehalt in verschiedenen Zelllinien

Durch die Verwendung quantitativer Taqman-Echtzeit-PCR (Taqman qPCR) (Kap. 2.2.2.6) wurde der *LGR5*-mRNA-Gehalt verschiedener Tumorzelllinien sowie der Keratinozytenzelllinie HaCaT und einer Fibroblastenzelllinie (in der Arbeitsgruppe etabliert) bestimmt. In allen untersuchten Zelllinien ist *LGR5*-mRNA nachweisbar (Abb. 3.1). Den geringsten *LGR5*-mRNA-Gehalt weist die Keratinozytenzelllinie HaCaT auf. Den höchsten *LGR5*-mRNA-Gehalt haben die Zelllinien SKBR3, HT29, RD, LN229, HeLa, SAOS-2 und auch die Fibroblastenzelllinie. Die Höhe des *LGR5*-mRNA-Gehalts ist unabhängig vom Zelltyp stark unterschiedlich. So ist in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 ein hoher *LGR5*-mRNA-Gehalt zu beobachten, während die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 nur wenig *LGR5*-mRNA aufweisen. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 ist ein hoher *LGR5*-mRNA-Gehalt zu verzeichnen, wohingegen die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 einen niedrigen endogenen *LGR5*-mRNA-Gehalt aufweist.

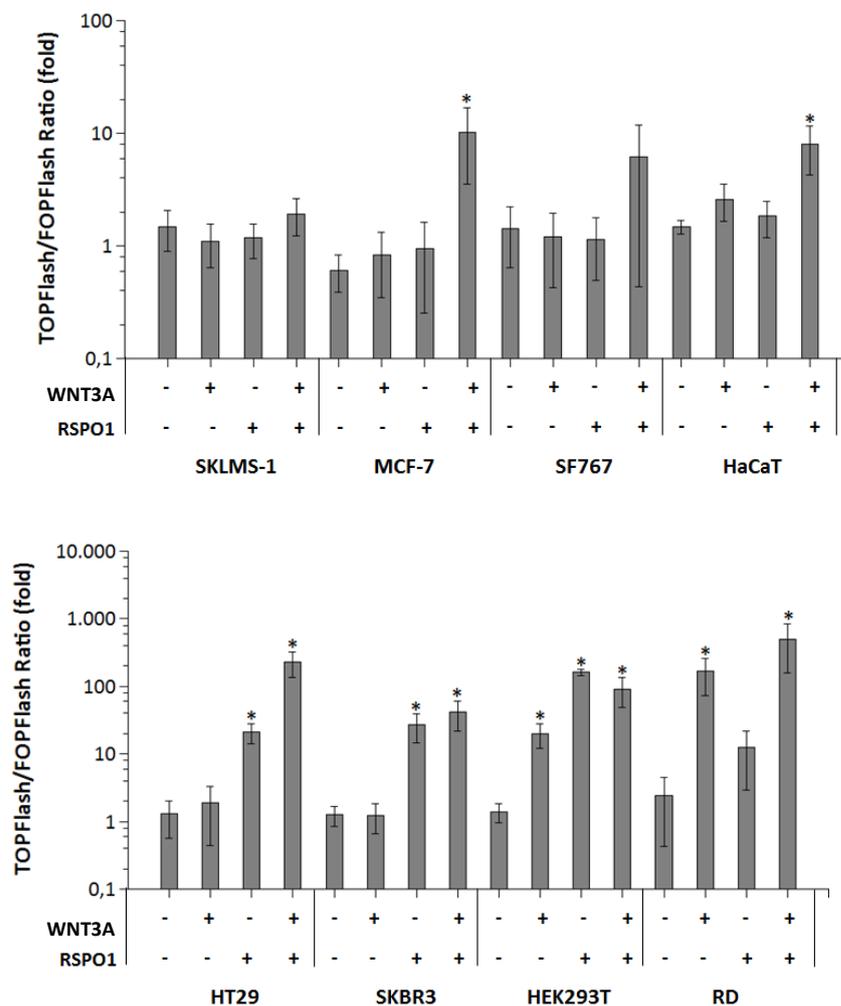


**Abb. 3.1: *LGR5*-mRNA-Gehalt verschiedener Zelllinien.** Dargestellt ist der relative *LGR5*-mRNA-Gehalt unterschiedlicher Zelllinien. Als Referenzen wurde *RPII* herangezogen. Die Auswertung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Unter den Weichteilsarkom-(WTS)-zelllinien hat die Rhabdomyosarkomzelllinie RD den höchsten *LGR5*-mRNA-Gehalt, während sich der *LGR5*-mRNA-Gehalt der anderen untersuchten WTS-Zelllinien als niedrig (A204, US 8-93, SKLMS-1) bzw. moderat (LMS 6-93) darstellt. Ein ähnliches Bild ist auch in den Glioblastomzelllinien zu beobachten, bei denen der *LGR5*-mRNA-Gehalt in der Zelllinie LN229 hoch, in der Zelllinie LN308 moderat und in den Zelllinien U87, U251, U343 und SF767 niedrig ist. Lediglich die vier untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien FADU, SAS, CAL33 und XF354 weisen allesamt einen niedrigen *LGR5*-mRNA-Gehalt auf.

### 3.2 Untersuchung der Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges in unterschiedlichen Zelllinien

Zunächst wurde die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges in unterschiedlichen Tumorzelllinien (MCF-7, SKLMS-1, SF767, HT29, SKBR3 und RD) sowie in der Keratinozytenzelllinie HaCaT und der Zelllinie HEK293T mithilfe des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Reporters TOPFlash-Assay untersucht (Kap. 2.2.1.9). Dieser Assay erlaubt eine Aussage über die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges (Kap. 2.2.1.9). Die gemessenen TOPFlash bzw. FOPFlash-Signale wurden wie im Kap. 2.2.1.9 beschrieben ausgewertet. Eine Zusammenfassung der Daten ist im Anhang dargestellt (Tabelle 7.5).



**Abb. 3.2: Aktivität des TOPFlash-Reporters.** Dargestellt sind die *ratios* TOPFlash/FOPFlash ohne (-) oder mit (+) Behandlung mit 150 ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1. \* kennzeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle [*fold change* (Stimulation)]. ( $n=3$ ). Für die Berechnung der Standardabweichungen der *ratios* (TOPFlash/FOPFlash) sowie für alle T-Tests wurden die absoluten, normalisierten Messwerte herangezogen. (s. Kap. 2.2.4).

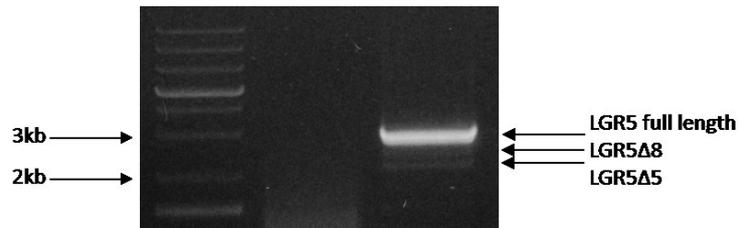
Die alleinige Inkubation der Zellen mit dem kanonischen Frizzled-Liganden WNT3A führt in den Zelllinien HEK293T (*fold change*=14,38;  $p=0,003$ ) und RD (*fold change*=68,51;  $p=0,01$ ) zu einer

signifikanten Erhöhung der TOPFlash-Aktivität im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle (Abb. 3.2; Tabelle 7.5). Folglich ist die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch alleinige Stimulierung mit WNT3A in diesen beiden Zelllinien möglich. Durch die alleinige Zugabe des LGR5-Liganden RSPO1 ist eine signifikante Steigerung des TOPFlash-Signals im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle in den Zelllinien HT29 (*fold change*=16,32;  $p=0,002$ ); SKBR3 (*fold change*=21,5;  $p=0,01$ ), und HEK293T (*fold change*=116,33;  $p \leq 0,001$ ) festzustellen (Abb. 3.2; Tabelle 7.5). In diesen Zelllinien kann der kanonische Wnt-Signalweg demnach durch eine alleinige Stimulierung mit RSPO1 aktiviert werden. Eine kombinierte Behandlung mit WNT3A und RSPO1 resultiert in allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme der WTS-Zelllinie SKLMS-1 in einer signifikanten Steigerung (Zelllinie SF767 nicht signifikant) der TOPFlash-Aktivität – verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen (Abb. 3.2; Tabelle 7.5). Die Betrachtung der *fold change*-Werte zeigt, dass eine kombinierte Stimulierung mit WNT3A und RSPO1 – mit Ausnahme der HEK293T- und SKLMS-1-Zellen – die stärkste TOPFlash-Aktivierung bewirkt (Abb. 3.2; Tabelle 7.5). In der Zelllinie HEK293T ist das stärkste TOPFlash-Signal nach alleiniger Stimulierung mit RSPO1 zu beobachten. In der Zelllinie SKLMS-1 ist eine deutliche Änderung der TOPFlash-Aktivität nach Agonisten-Zugabe im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen nicht zu beobachten. Der TOPFlash-Assay wurde standardmäßig in Kulturmedium mit Zusatz von 0,1 % FKS durchgeführt. Für die Zelllinie HEK293T ist zusätzlich zu beobachten, dass die Erhöhung der FKS-Konzentration im Kulturmedium auf 10 % eine Steigerung der TOPFlash-Aktivität bewirkt (Daten nicht gezeigt). Deshalb ist von einer verstärkten Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges unter Standardkultivierungsbedingungen (10 % FKS) auszugehen. Zusammenfassend ist der Wnt-Signalweg – mit Ausnahme der Zelllinie SKLMS-1 – in allen untersuchten Zelllinien entweder durch WNT3A oder RSPO1 sowie durch die kombinierte Behandlung mit den beiden Agonisten aktivierbar.

### 3.3 Identifizierung der LGR5 $\Delta$ 5 Spleißvariante

Für die Herstellung eines *LGR5*-Expressionsplasmids wurde die kodierende *LGR5*-Sequenz unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide LGR5 full 207 fw und LGR5 full 3137 rev in einer *high fidelity*-PCR-Reaktion aus cDNA amplifiziert (Kap. 2.2.2.5.2). Die verwendete cDNA wurde mittels Oligo-dT-Primern aus der RNA der WTS-Zelllinie RD erzeugt (Kap. 2.2.2.4). Aufgrund der geringen Menge des so erhaltenen PCR-Produkts wurde nach erfolgter Gelextraktion eine *nested* PCR mit den Primern LGR5 298 fw und LGR5 3106 rev durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.3). Als Ergebnis sind im Gelbild zusätzlich zur erwarteten Bande bei ca. 3000bp zwei weitere, niedrigere Banden zu beobachten, die deutlich schwächer sind. Die drei Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach erfolgter Gelextraktion in einen Vektor (pJet1.1/*blunt*) kloniert. Die aus Übernachtskulturen isolierten Plasmide wurden sequenziert. Als Ergebnis zeigt sich, dass die größte Bande das *full length LGR5* (*LGR5FL*, 2808bp) darstellt. Bei den anderen beiden Banden handelt es sich ebenfalls um *LGR5*, in der Sequenz fehlt jedoch

entweder das Exon 5 oder Exon 8. Somit handelt es sich bei den zusätzlich identifizierten Banden um Varianten des *LGR5*, welche durch alternatives Spleißen entstanden sind.



**Abb. 3.3:** Ergebnis der *high fidelity*-PCR-Reaktion zur Amplifikation der kodierenden *LGR5*-Sequenz. Dargestellt ist das Ergebnis der *high fidelity*-PCR mit den Oligonukleotiden LGR5 298 fw und LGR5 3106 rev mit der cDNA der Zelllinie RD.

Zu diesem Zeitpunkt war die Variante mit herausgespleißtem Exon 8 in der NCBI Datenbank zu finden, während die Variante mit herausgespleißtem Exon 5 noch nicht beschrieben war. Durch alternatives Spleißen wird das Exon 5 (Position 740-955 in der *LGR5 full length*-mRNA) oder das Exon 8 (Position 1097-1168 in der *LGR5 full length*-mRNA) entfernt, wobei der Leserahmen unverändert bleibt, was deswegen lediglich ein verkürztes Protein zur Folge hat.

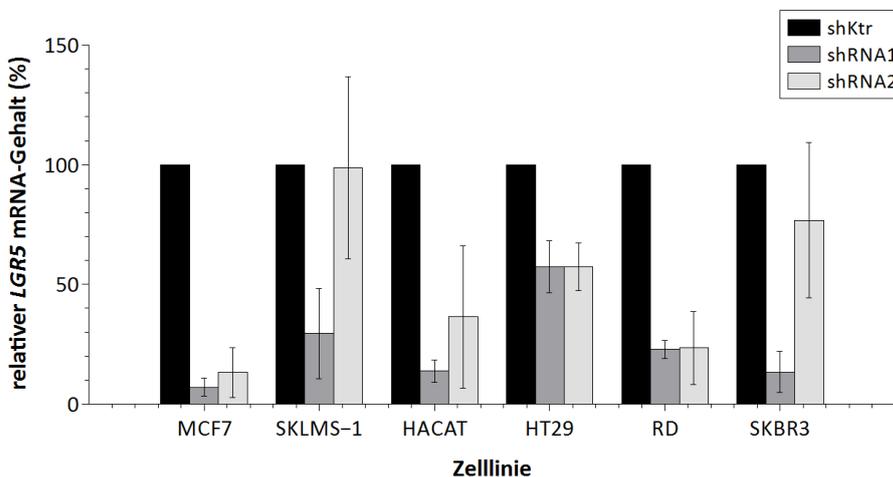
### 3.4 Etablierung von Zelllinien mit stabil veränderter *LGR5*-Expression

Für die Untersuchung der zell- und molekularbiologischen Bedeutung von *LGR5 full length* (FL) und der neu identifizierten Spleißvariante *LGR5* Exon5 ( $\Delta 5$ ) wurden Zellkulturen mit einer stabil verringerten *LGR5*-Expression sowie Zellkulturen mit einer stabil verstärkten *LGR5FL*- bzw. *LGR5* $\Delta 5$ -Expression etabliert. Zur Reduktion der *LGR5*-Expression wurden zwei shRNA-Konstrukte (shRNA1 und shRNA2), welche sowohl gegen *LGR5FL* als auch gegen die Spleißvarianten *LGR5* $\Delta 5$  und *LGR5* $\Delta 8$  gerichtet sind (*LGR5*(gesamt)), eingesetzt. Durch den Einsatz von zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten können die *off target*-Effekte, welche beim Einsatz von siRNAs bzw. shRNAs auftreten, besser beurteilt werden. Als Kontrolle dient ein shRNA-Konstrukt (shKtr), das keine Zielsequenz im humanen Genom hat. Die verwendeten shRNA-Konstrukte lagen kloniert in dem lentiviralen Expressionsvektor pLKO.1 (Sigma Aldrich) vor (Tabelle 2.3). Zur verstärkten Expression von *LGR5FL* und *LGR5* $\Delta 5$  wurden lentivirale Expressionsplasmide (pLVX) unter Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors (Kap.2.2.2.7) eingesetzt. Als Kontrolle dient in diesem Fall der pLVX-Leervektor (LVKtr). Die Expressionsplasmide wurden durch lentiviralen Gentransfer (Kap. 2.2.1.2) in die Tumorzelllinien eingebracht, wodurch die genomische Integration der jeweiligen Expressionskassetten und damit eine stabile Expression der shRNAs bzw. eine stabile Expression von *LGR5FL* und *LGR5* $\Delta 5$  erreicht wird. Die Reduktion der *LGR5*-Expression erfolgt in Zelllinien mit einem hohen endogenen *LGR5*-mRNA-Gehalt: HT29 (Kolonkarzinom), RD (Rhabdomyosarkom) und SKBR3 (Mammakarzinom) und in Zelllinien mit einem niedrigen endogenen *LGR5*-mRNA-Gehalt: MCF-7 (Mammakarzinom), SKLMS-1 (Leiomyosarkom) und HaCaT (Keratinozytenzelllinie). Die Überexpression von *LGR5FL* bzw. *LGR5* $\Delta 5$  erfolgt in Zelllinien mit einem niedrigen endogenen

*LGR5*-mRNA-Gehalt: MCF-7, SKLMS-1, HaCaT und SF767 (Glioblastom) und in der Zelllinie HT29 mit einem hohen endogenen *LGR5*-mRNA-Gehalt.

### 3.5 Nachweis einer veränderten *LGR5* Expression auf RNA- und Proteinniveau

Die quantitative Bestimmung des *LGR5*-mRNA-Gehalts erfolgte durch quantitative SYBR-Green-Echtzeit-PCR. Die bei der PCR eingesetzten Oligonukleotide detektieren alle drei *LGR5*-Varianten, also *LGR5*(gesamt). Für die jeweilige PCR-Reaktion wurden 20 ng cDNA eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte unter Einbeziehung eines Plasmid-DNA Standards, als Referenzgen wurde *HPRT* verwendet. In Voruntersuchungen wurden fünf shRNAs gegen *LGR5*(gesamt) (Tabelle 2.3) in den Zelllinien HT29 und MCF7 auf ihre Effektivität hin getestet. Es zeigte sich, dass nur drei shRNAs den *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalt deutlich reduzierten (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für die weiteren Untersuchungen nur die zwei effektivsten shRNA-Konstrukte (shRNA1 und shRNA2) verwendet (Tabelle 2.3).

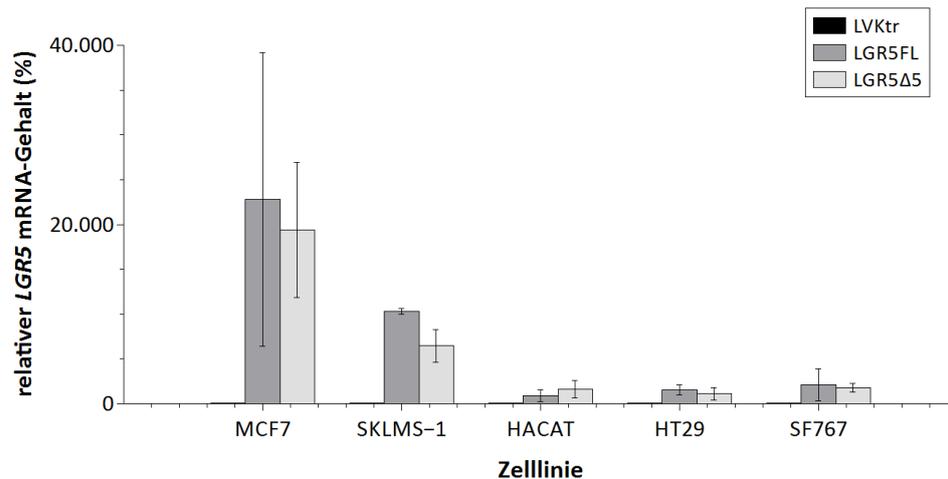


**Abb. 3.4: *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalt nach Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2.** Dargestellt ist der relative *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalt bezogen auf die *non target*-Kontrolle (shKtr). Die *non target*-Kontrolle ist auf 100 % gesetzt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion der *LGR5*-Expression. Als Referenzgen wurde *HPRT* herangezogen. Die Auswertung erfolgte absolut unter Zuhilfenahme eines Plasmidstandards. Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4.

Die Analyse zeigt, dass der *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalt in den sechs untersuchten Zelllinien (MCF-7, HT29, HaCaT, SKBR3, RD, SKLMS-1) nach Transduktion der shRNAs (shRNA1 bzw. shRNA2) um 50–80 % im Vergleich zur Kontrolle (shKtr) reduziert wird (Abb. 3.4). Im Vergleich zur Kontrolle (shKtr) kann in den Zelllinien MCF-7, RD, SKBR3 und HaCaT mit dem shRNA-Konstrukt shRNA1 eine Reduktion des *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalts um ca. 80 % und in den Zelllinien HT29 und SKLMS-1 um ca. 50 % erzielt werden (Abb. 3.4). Das shRNA-Konstrukt shRNA2 bewirkt eine Reduktion des *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalts um ca. 80 % in den Zelllinien MCF-7 und RD und um ca. 10% bis 50 % (zelllinienabhängig) in den Zelllinien HT29, SKLMS-1, SKBR3 und HaCaT (Abb. 3.4). Eine deutliche Reduktion des *LGR5*-Proteingehalts nach Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 (sh1) (Abb. 3.6) im Vergleich zur Kontrolle (shKtr) ist lediglich in den Zelllinien HT29 und RD zu beobachten. In den Zelllinien MCF-7, SKLMS-1 und HaCaT ist bereits der endogene

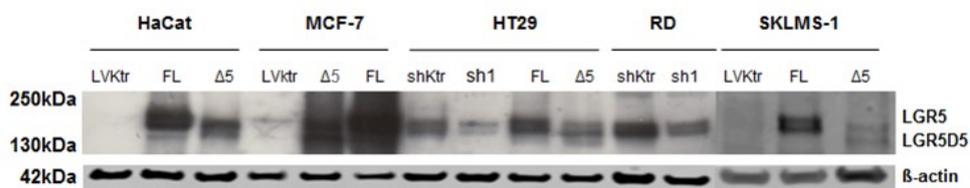
LGR5-Proteingehalt sehr gering und somit ein möglicher Effekt einer shRNA-Transduktion im Western Blot nicht visualisierbar.

Die Transduktion der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide hat im Vergleich zum endogenen *LGR5(gesamt)*-mRNA-Gehalt, in den Zelllinien MCF-7 und SKLMS-1 einen 200fach erhöhten *LGR5(gesamt)*-mRNA-Gehalt und in den Zelllinien HT29, HaCaT und SF767 einen 10fach erhöhten *LGR5(gesamt)*-mRNA-Gehalt zur Folge (Abb. 3.5). Im Western Blot kann nach Transduktion des *LGR5FL*-Expressionsplasmids (FL) in den Zelllinien MCF-7, SKMS-1 und HaCaT ein im Vergleich zur Leervektorkontrolle (LVKtr) deutlich erhöhter LGR5FL-Proteinlevel beobachtet werden (Abb. 3.6).



**Abb. 3.5: *LGR5(gesamt)*-mRNA-Gehalt nach Transduktion der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide.** Dargestellt ist der relative *LGR5(gesamt)*-mRNA-Gehalt bezogen auf die pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr), wobei diese auf 100 % gesetzt wurde. *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* bezeichnet die Transduktion mit den *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmiden. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Als Referenzgen wurde *HPRT* herangezogen. Die Auswertung erfolgte absolut unter Zuhilfenahme eines Plasmidstandards. Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4.

Analog dazu resultiert die Transduktion des *LGR5Δ5*-Expressionsplasmides ( $\Delta 5$ ) in den Zelllinien MCF-7, SKLMS-1 und HaCaT in einem deutlich erhöhten LGR5 $\Delta 5$ -Proteingehalt. Dagegen hat in der Zelllinie HT29 die Transduktion der *LGR5FL*(FL)- und *LGR5Δ5*( $\Delta 5$ )-Expressionsplasmide nur eine geringe Erhöhung des LGR5FL- und LGR5 $\Delta 5$ -Proteingehaltes zur Folge (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Western Blot-Analyse nach Modulation der *LGR5*-Expression.** Für die Analyse wurden 30 $\mu$ g Gesamtproteinlysate eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem gegen LGR5 (N-Terminus) gerichteten Antikörper.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, sh1 die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 zur Reduktion der *LGR5*-Expression, FL die Transduktion des *LGR5FL*-Expressionsplasmids und  $\Delta 5$  die Transduktion des *LGR5Δ5*-Expressionsplasmids. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle.

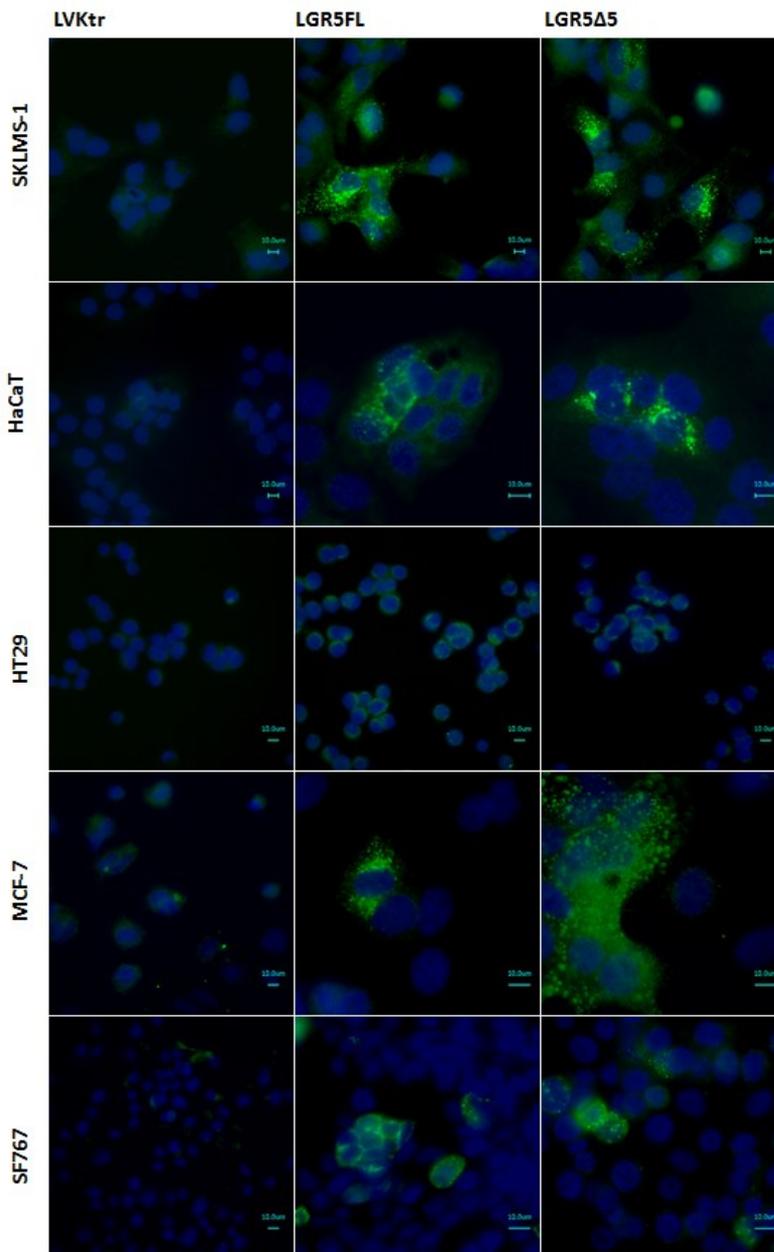
Eine Unterscheidung der LGR5-Varianten im Western Blot ist aufgrund der unterschiedlichen Größe der Proteine möglich. Das LGR5 $\Delta$ 5-Protein ist kleiner als das LGR5FL-Protein und hat daher eine niedrigere Laufhöhe (Abb. 3.6). Darüber hinaus ist der Proteingehalt des mittels des LGR5FL-Expressionsplasmides überexprimierten LGR5FL in allen untersuchten Zelllinien (MCF-7, SKLMS-1, HaCaT und HT29) höher als der Proteingehalt des durch das LGR5 $\Delta$ 5-Expressionsplamid überexprimierten LGR5 $\Delta$ 5 (Abb. 3.6). Das endogene LGR5-Protein kann nur in den Zelllinien HT29 und RD detektiert werden, wobei hier eine deutliche Unterscheidung der LGR5-Varianten nicht möglich ist (Abb. 3.6). Die Detektion von LGR5 im Western Blot erwies sich allgemein als schwierig. Von den fünf getesteten anti-LGR5-Antikörpern war nur ein Antikörper (Miltenybiotek) spezifisch und sensitiv, jedoch aufgrund der geringen Stabilität dieses Antikörpers zeitlich nur begrenzt einsetzbar.

Zusammenfassend ist bei den Zelllinien mit einer hohen endogenen *LGR5*-Expression (HT29, SKBR3 und RD) nach Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 eine deutliche Reduktion des *LGR5*(gesamt)-mRNA- und LGR5-Proteingehalts (HT29 und RD) zu beobachten. In den Zelllinien mit einer niedrigen endogenen *LGR5*-Expression (MCF-7; HaCaT, und SKLMS-1) bewirkt die Transduktion der shRNA1 und shRNA2 eine Reduktion des *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalts. Der endogene LGR5-Proteingehalt sowie eine shRNA vermittelte Reduktion des LGR5-Proteingehalts ist in diesen drei Zelllinien (MCF-7, HaCaT und SKLMS-1) nicht nachweisbar bzw. liegt an der Nachweisgrenze (MCF-7). Die Transduktion der LGR5FL- und LGR5 $\Delta$ 5-Expressionsplasmide resultiert in allen untersuchten Zelllinien (MCF-7, HaCaT, SKLMS-1, HT29 und SF767) in einer Steigerung des *LGR5*(gesamt)-mRNA-Gehalts und in den Zelllinien MCF-7, HaCaT, SKLMS-1 und HT29 in einem erhöhten LGR5FL- bzw. LGR5 $\Delta$ 5-Proteingehalt.

### 3.6 Lokalisation des überexprimierten LGR5FL- und LGR5 $\Delta$ 5-Proteins in der Zelle

Nachdem auf mRNA- und Proteinniveau nachgewiesen wurde, dass die mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln behandelten Zellen stabil *LGR5FL* bzw. *LGR5 $\Delta$ 5* überexprimieren, wurde die Lokalisation der überexprimierten Proteine in den Zellen untersucht. Über die Verteilung des überexprimierten Proteins in den Zellen können Rückschlüsse auf dessen Funktionalität gezogen werden. Die Überexpression des mit dem Flag-Tag-C-terminal-fusionierten LGR5FL resultiert in der Glioblastomzelllinie U251 in der Akkumulation des überexprimierten LGR5FL im Endoplasmatischen Retikulum (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf ein fehlerhaftes *sorting* und/oder eine fehlerhafte Faltung des überexprimierten Proteins in der Zelle hin. Das durch lentivirale Transduktion in die Zellen eingebrachte LGR5FL bzw. LGR5 $\Delta$ 5 ist N-terminal mit einem Myc-Tag gekoppelt. Somit kann das überexprimierte Protein in der Immunfluoreszenz mittels eines anti-Myc-Tag-Antikörpers detektiert werden. Die Zellen wurden auf Deckgläschen unter normalen Kultivierungsbedingungen kultiviert und die anschließende Immunfluoreszenzfärbung wie in Kap.2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. In allen untersuchten Zelllinien ist das überexprimierte LGR5FL- bzw. LGR5 $\Delta$ 5-Protein unter diesen Bedingungen in Vesikeln lokalisiert, welche gleichmäßig im Zytoplasma verteilt

vorliegen. (Abb. 3.7) Eine Membranlokalisation des überexprimierten Rezeptors kann unter den normalen Kultivierungsbedingungen (Kap. 2.2.1.1) nicht beobachtet werden. Analog zu den Beobachtungen in der Western Blot Analyse (Abb. 3.6) ist in den Immunfluoreszenzfärbungen der höchste Proteingehalt in der Zelllinie MCF-7 zu beobachten. Demgegenüber ist in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 die Anzahl der LGR5 überexprimierenden Zellen hoch, während die Expressionsstärke pro Zelle jedoch relativ gering ist.

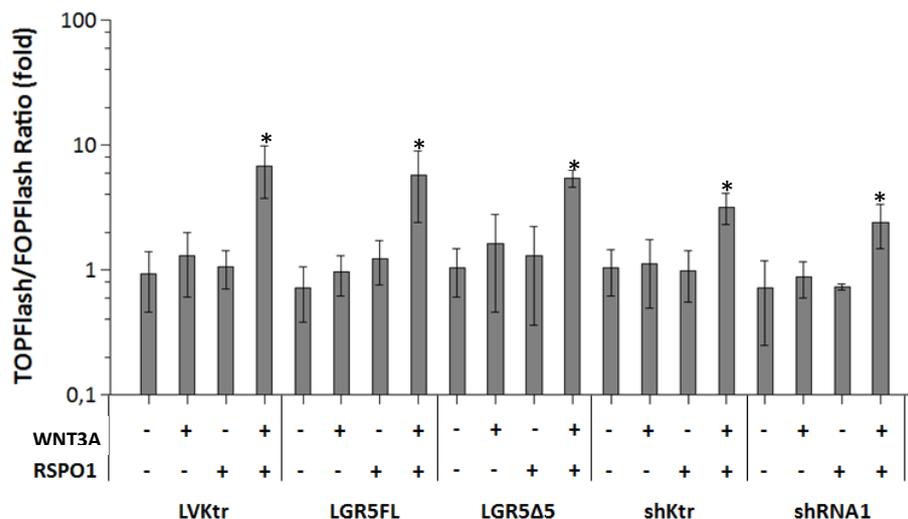


**Abb. 3.7: Lokalisation des überexprimierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in verschiedenen Zelllinien.** Dargestellt sind die Immunfluoreszenzfärbungen von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden Zellen und der Leervektorkontrolle (LVKtr) in unterschiedlichen Zelllinien. Die Zellen wurden auf Deckgläschen mittels anti Myc-Tag Antikörpers und des entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (FITC) gefärbt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung. Die Markierung rechts im Bild entspricht 10µm.

### 3.7 Einfluss einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges

Die Effekte einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges wurden unter Verwendung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Reporters TOPFlash-

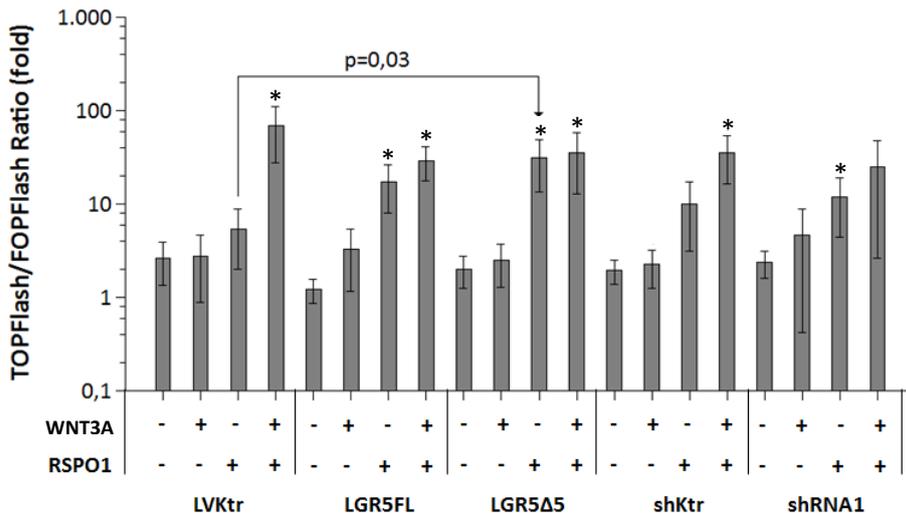
Assay untersucht (Kap. 2.2.1.9, Kap. 3.2). Die gemessenen TOPFlash bzw. FOPFlash-Signale wurden wie im Kap. 2.2.1.9. ausgewertet. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ist eine signifikante Erhöhung der TOPFlash-Aktivität im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen nur nach Co-Stimulierung mit 150 ng/ml WNT3A und 150 ng/ml RSPO1 zu beobachten. Eine alleinige Stimulierung mit WNT3A oder RSPO1 erhöht die Aktivität des TOPFlash-Reporters in dieser Zelllinie nicht. (Abb. 3.8; Tabelle 7.6; vergl. Kap. 3.2). Die Transduktion der LGR5FL-, LGR5Δ5- sowie shRNA1-Expressionsplasmide in den MCF-7-Zellen hat, unabhängig von der Art der Stimulierung, keine zusätzlichen Effekte auf die TOPFlash-Aktivität (Abb. 3.8; Tabelle 7.6).



**Abb. 3.8: Aktivität des TOPFlash-Reporters in den MCF-7-Zellen nach Transduktion der shRNA1- bzw. der LGR5FL- und LGR5Δ5-Expressionsplasmide.** Dargestellt sind die *ratio* TOPFlash/FOPFlash ohne (-) oder mit (+) Behandlung mit 150ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1. \* kennzeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle [*fold change* (Stimulation)]. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 das eingesetzte shRNA-Konstrukt zur Reduktion der *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5- Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. (n=4) Statistische Analyse s. Kap.2.2.4.

In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 kann eine signifikante Steigerung der Aktivität des TOPFlash-Reporters, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, sowohl nach alleiniger Behandlung mit RSPO1 als auch nach Co-Stimulation mit WNT3A und RSPO1 beobachtet werden (Abb. 3.9; Tabelle 7.7; vergl. Kap. 3.2). Eine Ausnahme bilden hier die Behandlungen LVKtr RSPO1(+) (*fold change* (Stimulation)=2,06;  $p=0,13$ ), shKtr RSPO(+), (*fold change* (Stimulation)=5,18;  $p=0,06$ ) sowie shRNA1 WNT3A(+),RSPO(+), (*fold change* (Stimulation)=10,53;  $p=0,06$ ) – hier ist die Erhöhung der TOPFlash-Aktivität nicht signifikant. Die Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA1 in den HT29-Zellen hat unabhängig von der Art Stimulierung keine zusätzlichen Effekte auf die Aktivität des TOPFlash-Reporters (Abb. 3.9; Tabelle 7.7). Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide führt nach alleiniger Zugabe von RSPO1 zu einem Anstieg der Aktivität des TOPFlash-Reporters um den Faktor 3,18 (*fold change* (*LGR5FL*-Überexpression)=3,18;  $p=0,06$ ) bzw.

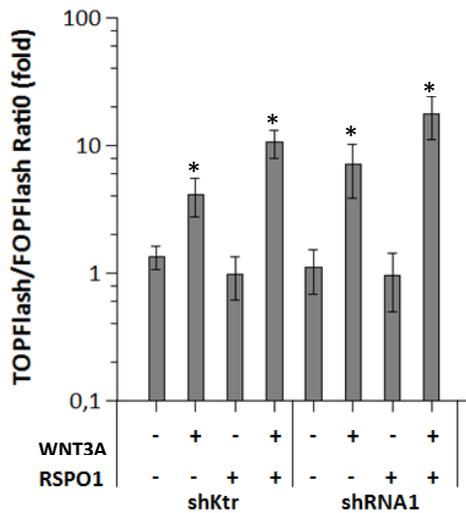
5,72 (*fold change* (*LGR5Δ5*-Überexpression)=5,72;  $p=0,03$ ) im Vergleich zur Leervektorkontrolle LVKtr. (Abb. 3.9; Tabelle 7.7). Dagegen resultiert die Co-Stimulierung der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden Zellen mit WNT3A und RSPO1 in einer reduzierten Aktivität des TOPFlash-Reporters (*fold change* (*LGR5FL*-Überexpression)=0,42;  $p=0,07$ ) bzw. (*fold change* (*LGR5Δ5*-Überexpression)=0,51;  $p=0,2$ ). (Abb. 3.9; Tabelle 7.7). Ohne Stimulierung sowie unter alleiniger Applikation von WNT3A hat die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide keinen Einfluss auf die TOPFlash-Aktivität in den HT29-Zellen.



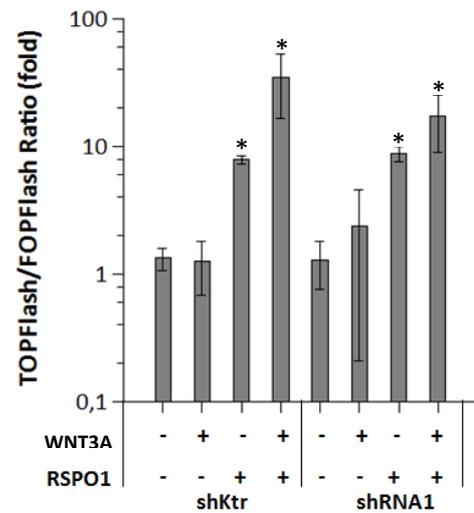
**Abb. 3.9: Aktivität des TOPFlash-Reporters in den HT29-Zellen nach Transduktion der shRNA1- bzw. der LGR5FL- und LGR5Δ5-Expressionsplasmide.** Dargestellt sind die *ratio* TOPFlash/FOPFlash ohne (-) oder mit (+) Behandlung mit 150 ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1. \* kennzeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle [*fold change* (Stimulation)]. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 das eingesetzte shRNA-Konstrukt zur Reduktion der *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*- Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. (n=4) Statistische Analyse s. Kap.2.2.4.

In der WTS-Zelllinie RD wird die Aktivität des TOPFlash-Reporters durch alleinige Zugabe von WNT3A und durch simultane Applikation von WNT3A und RSPO1 gesteigert — verglichen mit nicht-stimulierten Zellen. Die alleinige Stimulation der RD-Zellen mit RSPO1 hat keine Erhöhung des TOPFlash-Signals zur Folge (Abb. 3.10; Tabelle 7.8; vergl. Kap. 3.2). Die Reduktion der *LGR5*-Expression durch die shRNA1 in den RD-Zellen zeigt eine leichte, nicht signifikante Erhöhung des TOPFlash-Signals nach Co-Stimulierung mit WNT3A und RSPO1 um den Faktor 1,68 (*fold change* (Reduktion der *LGR5*-Expression)=1,68;  $p=0,16$ ) und um den Faktor 1,7 (*fold change* (Reduktion der *LGR5*-Expression)=1,7;  $p=0,22$ ) nach alleiniger Stimulierung mit WNT3A im Vergleich zur Kontrolle (shKtr) (Abb. 3.10; Tabelle 7.8). Die Reduktion der *LGR5*-Expression hat in nicht-stimulierten Zellen bzw. nach Zugabe von RSPO1 keinen Einfluss auf die Aktivität des TOPFlash-Reporters.

In der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 wird die Aktivität des TOPFlash-Reporters durch die alleinige Zugabe von RSPO1 und durch simultane Zugabe von RSPO1 und WNT3A gesteigert — verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen (Abb. 3.11; Tabelle 7.9; vergl. Kap. 3.2).



**Abb. 3.10: Aktivität des TOPFlash-Reporters in den RD-Zellen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels des shRNA-Konstrukts shRNA1.** Dargestellt sind die *ratio* TOPFlash/FOPFlash ohne (-) oder mit (+) Behandlung mit 150 ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1. \* kennzeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle [*fold change* (Stimulation)]. shKtr bezeichnet die *non target* shRNA Kontrolle, shRNA1 das eingesetzte shRNA-Konstrukt zur Reduktion der *LGR5*-Expression. (n=4). Statistische Analyse s. Kap.2.2.4..



**Abb. 3.11: Aktivität des TOPFlash-Reporters in den SKBR3-Zellen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels des shRNA-Konstrukts shRNA1.** Dargestellt sind die *ratio* TOPFlash/FOPFlash ohne (-) oder mit (+) Behandlung mit 150 ng/ml WNT3A bzw. 150 ng/ml RSPO1. \* kennzeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle [*fold change* (Stimulation)]. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 das eingesetzte shRNA-Konstrukt zur Reduktion der *LGR5*-Expression. (n=4). Statistische Analyse s. Kap.2.2.4.

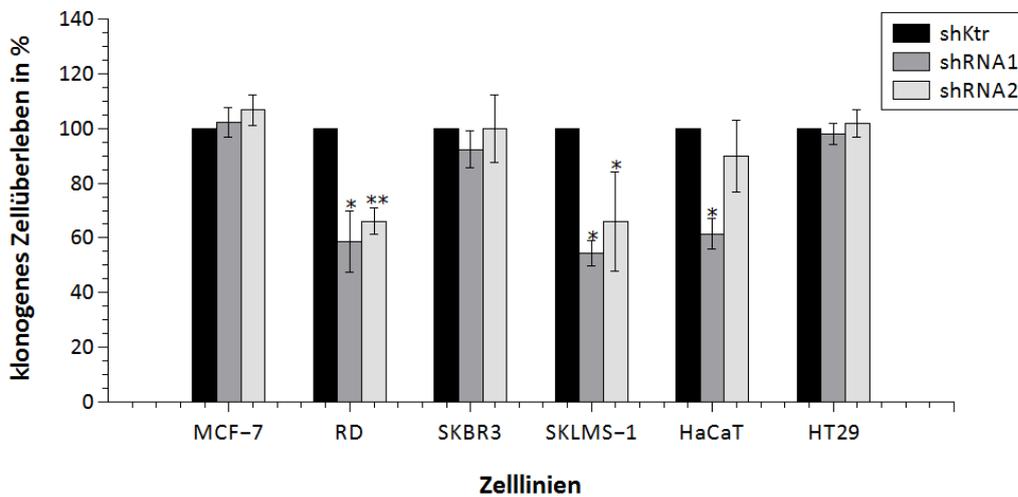
Die alleinige Stimulierung mit WNT3A hat in dieser Zelllinie keinen Einfluss auf die Aktivität des TOPFlash-Reporters. Die Reduktion der *LGR5*-Expression in den SKBR3-Zellen mittels der shRNA1 führt zu einer verringerten Aktivität des TOPFlash-Reporters nach Co-Stimulation mit WNT3A und RSPO1 (*fold change* (Reduktion der *LGR5*-Expression)=0,49;  $p=0,2$ ) (Abb. 3.11; Tabelle 7.9) im Vergleich zur shKtr-Kontrolle. Nicht-stimuliert sowie nach alleiniger WNT3A bzw. RSPO1-Stimulation hat die Transduktion des shRNA1-Expressionsplasmides keinen Einfluss auf die TOPFlash-Aktivität in den SKBR3-Zellen.

### 3.8 Einfluss einer veränderten *LGR5*-Expression auf das klonogene Zellüberleben

Der Effekt einer veränderten *LGR5*-Expression auf das klonogene Langzeitüberleben wurde mithilfe eines Zellkoloniebildungstests untersucht (Kap. 2.2.1.6).

Die Inhibierung der *LGR5*-Expression durch die shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 hat generell nur geringe Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben in den untersuchten Zelllinien. In den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und SKBR3 sowie in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 hat die Transduktion der shRNA1 und shRNA2 keinen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben (Abb. 3.12).

In der WTS-Zelllinie SKLMS-1 ist das klonogene Zellüberleben durch das Konstrukt shRNA1 signifikant um ca. 45 % ( $p=0,0002$ ) und durch shRNA2 um ca. 35 % ( $p=0,44$ ) nicht signifikant reduziert (Abb. 3.12).



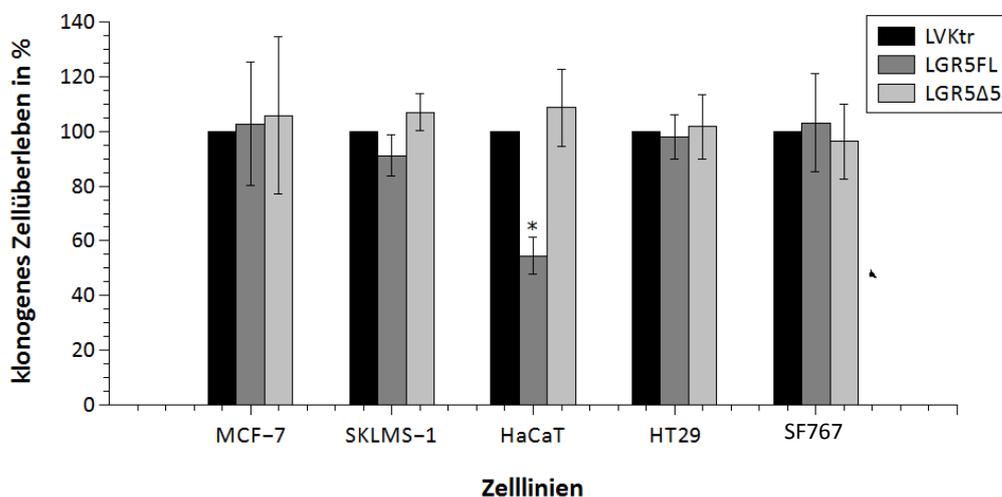
**Abb. 3.12: Relatives Zellüberleben nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2.** Relative Plattiereffizienz bezogen auf die *non target*-Kontrolle (shKtr). Die Plattiereffizienz der *non target*-Kontrolle ist auf 100 % gesetzt. \* bezeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Veränderung der Plattiereffizienz im Vergleich zu der jeweiligen *non target*-Kontrolle. \*\* bezeichnet ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$ . shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion *LGR5*-Expression. ( $n=4$ ). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 5 %; RD 21 %; SKBR3 8 %; SKLMS-1 17 %; HaCaT 8 % und HT29 2 %.

In der WTS-Zelllinie RD reduziert das shRNA-Konstrukt shRNA1 das klonogene Zellüberleben um 42 % ( $p=0,018$ ) und das shRNA-Konstrukt shRNA2 um 34 % ( $p=0,005$ ) (Abb. 3.12). In der Keratinozytenzelllinie HaCaT führt lediglich die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 zu einer signifikanten Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 40 % ( $p=0,02$ ), das Konstrukt shRNA2 beeinflusst das klonogene Zellüberleben nicht (Abb. 3.12).

Insgesamt führt die Reduktion der *LGR5*-Expression in den Tumorzelllinien mesenchymalen Ursprungs (SKLMS-1 und RD) zur Inhibierung des Koloniebildungspotenzials. In den Tumorzelllinien epithelialen Ursprungs (MCF-7, SKBR3 und HT29) hat die Reduktion der *LGR5*-Expression keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit in diesem Assay. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT, die ebenfalls epithelialen Ursprungs ist, sinkt das klonogene Zellüberleben nur durch den Einsatz des shRNA-Konstrukts shRNA1, während das shRNA2-Konstrukt keinen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben hat. Dieser Effekt korreliert mit der geringeren Effektivität dieses shRNA-Konstrukts, den *LGR5*-mRNA-Gehalt der HaCaT-Zelle zu reduzieren (Kap. 3.5). Im Gegensatz dazu können für die Zelllinien MCF-7, SKBR3 und HT29 solche Zusammenhänge nicht beobachtet werden.

Die Transduktion des *LGR5FL*-Expressionsplasmids hat nur in der Keratinozytenzelllinie HaCaT einen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben. Hier sinkt das Zellüberleben signifikant um ca. 50 % ( $p=0,017$ ) (Abb. 3.13). In den Zelllinien SKLMS-1, MCF-7, HT29 und SF767 dagegen wird das klonogene Zellüberleben durch die Transduktion des *LGR5FL*-Expressionsplasmids nicht beeinflusst

(Abb. 3.13). Die Transduktion des LGR5Δ5-Expressionsplasmids beeinflusst in keiner der genannten Zelllinien das klonogene Zellüberleben (Abb. 3.13).

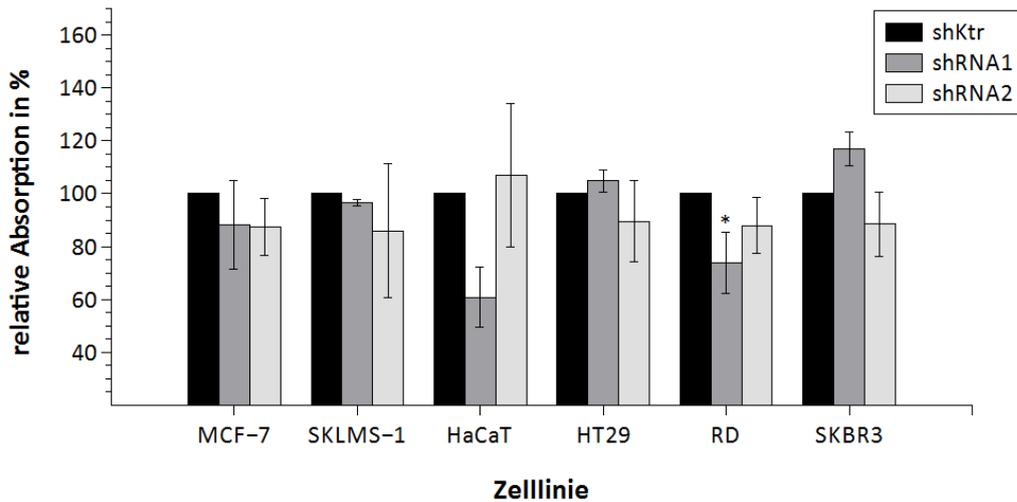


**Abb. 3.13: Relatives Zellüberleben in den LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden Zellen.** Relative Plattiereffizienz bezogen auf die pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr). Die Plattiereffizienz der pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr) ist auf 100 % gesetzt. \* bezeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Veränderung der Plattiereffizienz im Vergleich zu der jeweiligen *non target*-Kontrolle. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. ( $n=4$ ). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 20 %; SKLMS-1 10 %; HaCaT 16 %, HT29 11 % und SF767 15 %.

Insgesamt hat in diesem Assay – mit Ausnahme der Zelllinie HaCaT – die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide keinen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben der untersuchten Zelllinien (MCF-7, SKLMS-1, HT29, SF767). Die Untersuchung der Koloniebildung im Softagar bietet eine weitere Möglichkeit, die Klonogenität bzw. Tumorigenität der Zellen zu bestimmen. In diesem Test – im Gegensatz zum Koloniebildungstest, bei dem die Zellen in 2D adhären am Plastikboden der Kulturflaschen wachsen – erfolgt das Koloniewachstum dreidimensional in einer Agarmatrix, was den Umgebungsbedingungen der extrazellulären Matrix in einem Gewebe stärker ähnelt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien bildeten jedoch im Softagar unter den jeweilig untersuchten Versuchsbedingungen keine Kolonien, sodass dieser Test hier nicht angewendet werden konnte.

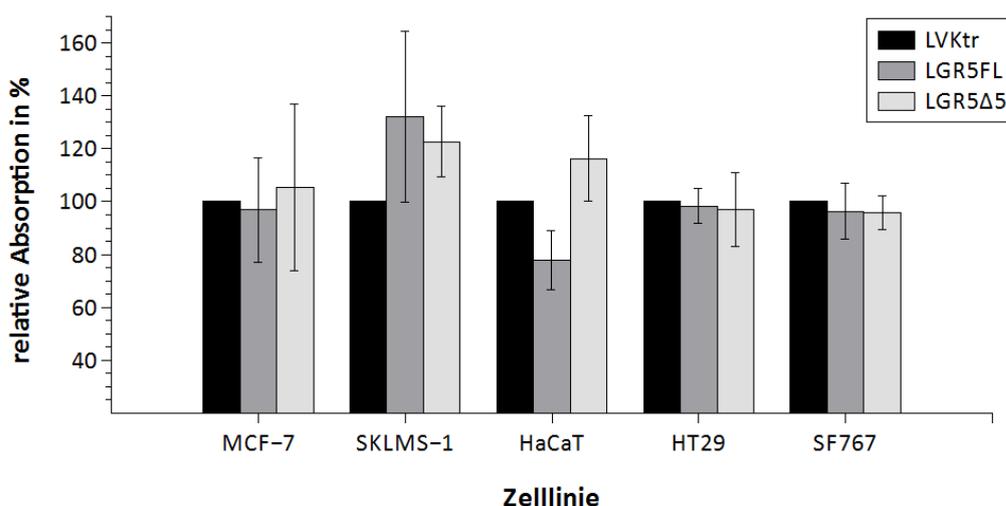
### 3.9 Einfluss einer veränderten LGR5-Expression auf das zelluläre Wachstum im SRB-Assay

Im SRB-Assay wurden die Auswirkungen einer veränderten LGR5-Expression auf das Zellwachstum untersucht (Kap. 2.2.1.8). Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5- sowie der shRNA1- und shRNA2-Expressionsplasmide hat nur geringe Effekte auf das Zellwachstum im SRB-Assay. Zudem waren die Schwankungen unter den einzelnen Versuchen teilweise sehr hoch, was sich in hohen Standardabweichungen widerspiegelt und die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse erschwert.



**Abb. 3.14: Relatives Zellwachstum nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 im SRB-Assay.** Relatives Zellwachstum bezogen auf die *non target*-Kontrolle (shKtr). Die shKtr wurde auf 100 % gesetzt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion der *LGR5*-Expression. (n=3). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 38 %; SKLMS-1 14 %; HaCaT 28 %; HT29 33 %, RD 11% und SKBR3 35 %.

Die Transduktion der shRNA-Expressionsplasmide hat nur in der WTS-Zelllinie RD eine signifikante Reduktion des zellulären Wachstums um 27 % ( $p=0,04$ ) nach Transduktion der shRNA1 zur Folge, während die shRNA2 das Wachstum um 13 % ( $p=0,1$ ) nicht signifikant reduziert. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT verringert eine Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA1 das Zellwachstum um 40 % ( $p=0,08$ ) nicht signifikant, während die Transduktion der shRNA2 das Zellwachstum nicht beeinflusst. In den Zelllinien MCF-7, SKLMS-1, HT29 und SKBR3 hat die Transduktion der shRNA-Konstrukten shRNA1 und shRNA2 keinen Einfluss auf das Zellwachstum im SRB-Assay (Abb. 3.14).



**Abb. 3.15: Relatives Zellwachstum der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden Zellen im (SRB-Assay).** Relatives Zellwachstum bezogen auf die pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr). Die Plattiereffizienz der pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr) ist auf 100 % gesetzt. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5- Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. (n=3). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 22 %; SKLMS-1 11%; HaCaT 30%; HT29 23% und SF767 16%

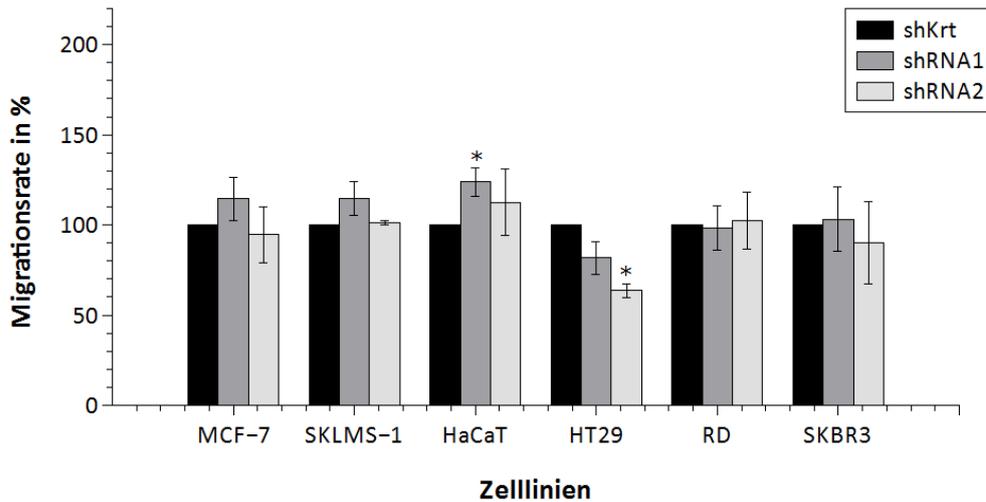
Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide hat keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum im SRB-Assay. In der WTS-Zelllinie SKLMS-1 ist eine nicht signifikante Zunahme des Zellwachstums um ca. 32 % ( $p=0,3$ ) in den LGR5FL bzw. um ca. 22 % ( $p=0,5$ ) in den LGR5Δ5 überexprimierenden Zellen zu beobachten. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT hat die Transduktion des LGR5FL-Expressionsplasmids eine schwache, nicht signifikante Verringerung des zellulären Wachstums um ca. 23 % ( $p=0,09$ ) zur Folge, wohingegen die Transduktion des LGR5Δ5-Expressionsplasmids keine deutliche Veränderung des Zellwachstums bewirkt. In den Zelllinien MCF-7, HT29 und SF767 hat die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide keinen Einfluss auf das zelluläre Wachstum (Abb. 3.15).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im SRB-Assay schwach ausgeprägte Effekte auf das Zellwachstum zu beobachten sind. In den Zelllinien MCF-7, SKBR3, HT29 und SF767 hat eine Modulation der *LGR5*-Expression keine Effekte auf das Zellwachstum. In der Zelllinie RD erfolgt eine schwache Reduktion des Zellwachstums durch die shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT führt sowohl die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 als auch des LGR5FL-Expressionsplasmids zu einer Reduktion der Zellwachstumsrate, während die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA2 sowie des LGR5Δ5-Expressionsplasmids keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. In der WTS-Zelllinie SKLMS-1 beeinflusst die Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNAs das Zellwachstum im SRB-Assay nicht, während die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide das Wachstum steigert.

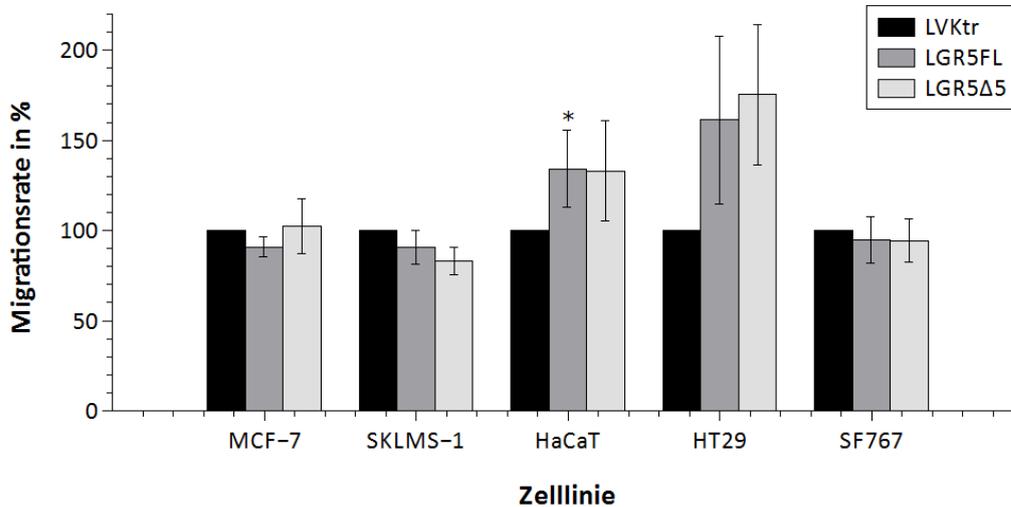
### 3.10 Einfluss einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Migration im Wundheilungsassay

Die Auswirkungen einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Migrationsfähigkeit der Zellen wurden im Wundheilungsassay (*scratch*-Assay) untersucht (Kap. 2.2.1.7).

In den Zelllinien RD, SKBR3, MCF-7 und SKLMS-1 beeinflusst die Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 die Migrationsrate der Zellen nicht signifikant (Abb. 3.16). In der Keratinozytenzelllinie HaCaT ist durch das shRNA-Konstrukt shRNA1 eine signifikante Steigerung der Migrationsrate um 20 % ( $p=0,008$ ) zu beobachten. Dagegen hat die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA2 keine signifikante Auswirkung auf die Migrationsrate der HaCaT-Zellen zur Folge. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 resultiert die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA2 in einer signifikanten Verringerung der Migrationsrate um 35 % ( $p=0,009$ ), während das shRNA-Konstrukt shRNA1 die Migrationsrate um 20 % ( $p=0,08$ ) nicht signifikant reduziert. Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide hat in den Zelllinien MCF-7, SKLMS-1 und SF767 keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (Abb. 3.17). In der Keratinozytenzelllinie HaCaT steigt die Migrationsrate nach Transduktion der LGR5FL- ( $p=0,04$ ) bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide um jeweils 40 %. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 führt die Transduktion der LGR5FL- ( $p=0,09$ ) bzw. LGR5Δ5- ( $p=0,09$ ) Expressionsplasmide zu einer nicht signifikanten Steigerung der Migrationsrate um 50 % bzw. 60 %.



**Abb. 3.16: Relative Migrationsrate nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2.** Relative Migrationsrate bezogen auf die *non target*-Kontrolle (shKtr). Die shKtr-Kontrolle ist auf 100 % gesetzt. \* bezeichnet eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Veränderung der Migrationsrate im Vergleich zu der jeweiligen *non target*-Kontrolle. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion der *LGR5*-Expression. (n=3). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 30 %; SKLMS-1 8 %; HaCaT 3 %; HT29 7 %; RD 5 % und SKBR3 19 %.



**Abb. 3.17: Relative Migrationsrate in den *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden Zellen.** Relative Migrationsrate bezogen auf die pLVX-Leervektor-Kontrolle (LVKtr). Die pLVX-Leervektor-Kontrolle ist auf 100 % gesetzt. \* bezeichnet eine signifikante Veränderung der Migrationsrate im Vergleich zu der jeweiligen pLVX-Leervektor-Kontrolle mit einem Signifikanzniveau  $\leq 0,05$ . *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* bezeichnet die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. (n=3). Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen betragen für MCF-7 40 %; SKLMS-1 2 %; HaCaT 6 %; HT29 17 % und SF767 13 %.

Es lässt sich demnach resümieren, dass die Transduktion der shRNAs- sowie der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide die Migrationsfähigkeit der Zelllinien MCF-7, SKLMS-1, SKBR3, RD und SF-767 nicht signifikant beeinflusst. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 resultiert die Transduktion der shRNAs in einer Reduktion der Migrationsrate, während die Transduktion der *LGR5FL*- bzw.

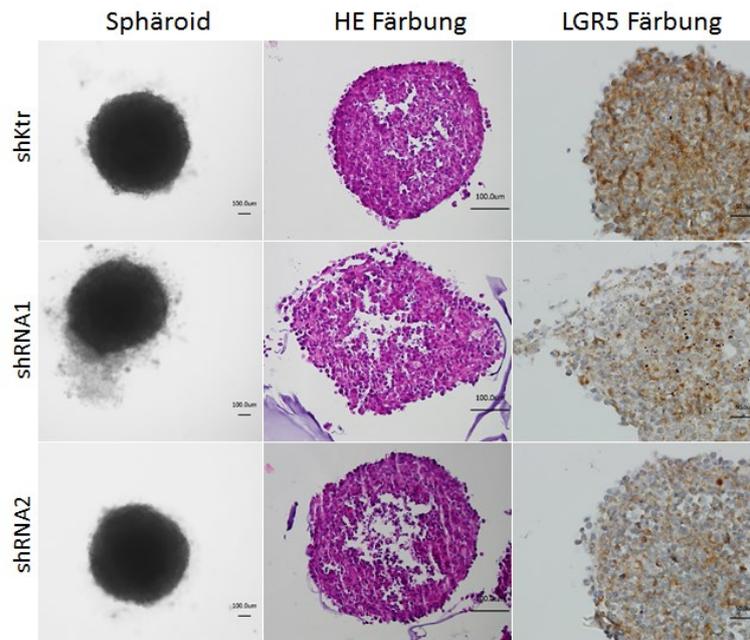
LGR5Δ5-Expressionsplasmide eine Erhöhung der Migrationsrate zur Folge hat. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT führt sowohl die Transduktion der shRNA1 als auch die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide zu einer Zunahme der Migrationsrate der Zellen und zeigen somit gleichgerichtete Effekte.

### 3.11 Einfluss einer veränderten *LGR5*-Expression auf das 3D-Wachstum (Sphäroidbildung)

Im Sphäroid-Assay wird in nicht adhärenter Kultur untersucht, wie sich eine Behandlung auf die Fähigkeit der Zellen auswirkt, sich zu dreidimensionalen Strukturen zusammenzufügen (Kap. 2.2.1.1). Ein Sphäroid zeigt einen spezifischen Aufbau mit funktional unterschiedlichen Regionen. Die Zellen an der Sphäroidoberfläche werden durch Diffusion weitgehend gut mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und sind daher vital und teilungsfähig. Mit zunehmender Entfernung von der Randzone nimmt die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen ab und der hypoxische Status der Zellen nimmt zu. Im Inneren des Sphäroids sind vermehrt apoptotische und nekrotische Zellen zu finden. Die Voraussetzung für dreidimensionales Wachstum von Zellkulturen in Form von Sphäroiden ist eine ausreichende Expression von Oberflächenadhärenzmolekülen sowie die Fähigkeit der Zellen, zu migrieren.

Mit Ausnahme der Glioblastomzelllinie SF767 sind alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien befähigt im Sphäroidbildungsassay Sphäroide auszubilden. Die Modulation der *LGR5*-Expression in den Zelllinien SKBR3 und HT29 beeinflusst die Sphäroidbildung dieser Tumorzellen nicht. Wohingegen eine veränderte *LGR5*-Expression in den Zelllinien SKLMS-1, HaCaT, MCF-7 und RD einen Einfluss auf die Sphäroidbildung der Zellen hat.

Die WTS-Zelllinie RD bildet in 3D-Kultur runde regelmäßige, wenig kompakte Gebilde mit einer wenig klaren äußeren Begrenzung (Abb. 3.18). Die Reduktion der *LGR5*-Expression mittels des shRNA-Konstrukts shRNA1 beeinflusst die Sphäroidgröße nicht, führt jedoch zur Ausbildung einer Korona von Einzelzellen und Mehrzellaggregaten um das Sphäroid. Nach Herstellung von Paraffinschnitten und anschließender HE-Färbung (Kap.2.2.3.4) ist nachweisbar, dass die Struktur der Sphäroide durch die Transduktion der shRNA1 im Vergleich zur Kontrolle shKtr stark aufgelockert ist. Der zellfreie Bereich im Inneren des Sphäroids ist größer als in der Kontrolle shKtr. Nach Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA2 in den RD-Zellen ist die Ausbildung einer Korona von Einzelzellen und Mehrzellaggregaten nicht zu beobachten. Allerdings zeigt die HE-Färbung der Sphäroidschnitte, dass die Transduktion der shRNA2 analog zur Transduktion der shRNA1, zur Ausdehnung des zellfreien Bereichs im Inneren des Sphäroids führt — verglichen mit der shKtr-Kontrolle. Dieser Effekt ist jedoch weniger stark ausgeprägt als nach Transduktion der shRNA1. Eine immunhistochemische Färbung mit dem anti-*LGR5*-Antikörper zeigt, dass in der Kontrolle shKtr nur ein Anteil der Zellen innerhalb des Sphäroids positiv für *LGR5* ist. Die Anzahl der *LGR5*-positiven Zellen sowie die Stärke der Färbung ist nach der Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 deutlich verringert (Abb. 3.18)

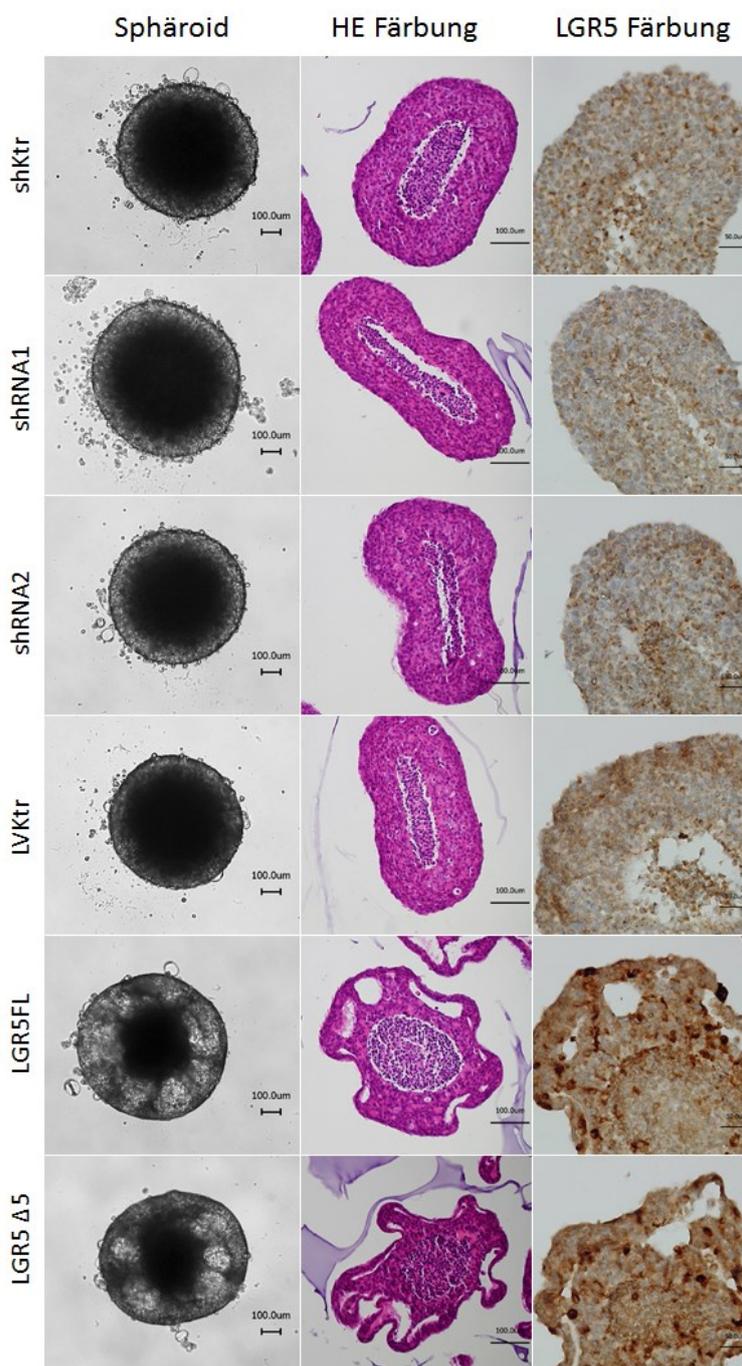


**Abb. 3.18: 3D-Kultur in der Zelllinie RD nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch *shRNA1* und *shRNA2*.** In der Sphäroid-Reihe ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) oder einem gegen Gesamt-LGR5 (*LGR5*-Färbung) gerichteten Antikörper behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion der *LGR5*-Expression. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100µm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50µm.

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bildet regelmäßige, runde, kompakte Sphäroide mit einer klaren äußeren Begrenzung. (Abb. 3.19). In den Paraffinschnitten dieser Sphäroide sind zwei Bereiche mit unterschiedlicher Struktur zu beobachten. Während die äußere Zellschicht einen kompakten Aufbau aufweist, ist im Inneren ein Zellbereich mit aufgelockerter Struktur zu finden. Die Reduktion der *LGR5*-Expression durch das shRNA-Konstrukt shRNA2 hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Sphäroidbildung der MCF-7-Zellen (Abb. 3.19). Die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 führt zur Ausbildung von ca. 10 % größeren ( $p=0,01$ ) (Abb. 3.20) und weniger kompakten Sphäroiden im Vergleich zur Kontrolle shKtr. Die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide hat in den MCF-7-Zellen einen geringen Einfluss auf die Größe der Sphäroide, (Abb. 3.20) während sich die innere Struktur im Vergleich zu der Leervektorkontrolle LVKtr stark verändert (Abb. 3.19). Es sind mehrere zellfreie Kammern zu beobachten. Eine immunhistochemische Färbung des *LGR5*-Proteins zeigt das Auftreten von einzelnen *LGR5*-positiven Zellen sowohl in den Kontrollen (shKtr und LVKtr) als auch nach Transduktion der shRNAs. Dabei ist eine deutliche Abschwächung der *LGR5*-Färbung nach Transduktion der shRNAs nicht zu erkennen. Dagegen kann nach lentiviraler Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide eine deutliche Zunahme der Zahl der *LGR5*-positiven Zellen sowie der Färbintensität beobachtet werden (Abb. 3.19).

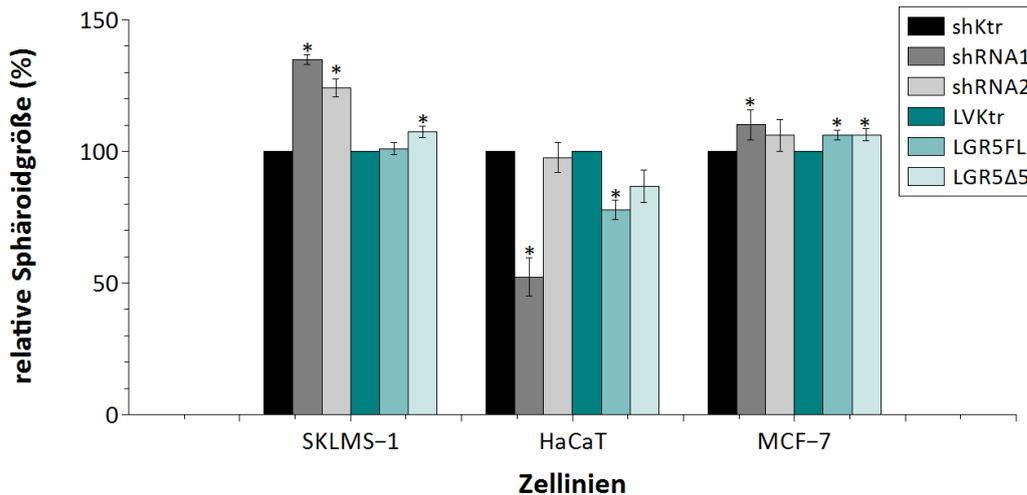
Die WTS-Zelllinie SKLMS-1 bildet in der 3D-Kultur unregelmäßige, kompakte Sphäroide, welche eine klare äußere Grenzstruktur aufweisen (Abb. 7.1). Die Reduktion der *LGR5*-Expression durch die shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 resultiert in den SKLMS-1 Zellen in der Ausbildung größerer und weniger kompakter Sphäroide, welchen eine klare äußere Begrenzung fehlt. Die Sphäroidgröße nimmt im Vergleich zur shKtr-Kontrolle durch die Transduktion der shRNA1 um ca. 35 % ( $p<0,001$ ) und der shRNA2 um ca. 25 % ( $p<0,001$ ) zu (Abb. 3.20). Die Struktur im Inneren der SKLMS-1

Sphäroide ist nach Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 im Vergleich zur shKtr-Kontrolle stark aufgelockert (HE-Färbung) und es ist eine Korona von Einzelzellen und Mehrzellaggregaten um das Sphäroid zu beobachten (Abb. 7.1). Diese Effekte sind nach Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 stärker ausgeprägt als nach der Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA2. Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide in den SKLMS-1 Zellen hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Sphäroide (Abb. 7.1). In den HE-Färbungen ist zu beobachten, dass Sphäroide der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden SKLMS-1 Zellen im Vergleich zu der Leervektorkontrolle LVKtr eine etwas kompaktere Strukturierung des Sphäroidinneren aufweisen (Abb. 7.1).



**Abb. 3.19: Sphäroide der Zelllinie MCF-7 nach Transduktion der shRNA- und LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide.** In der Sphäroid-Spalte ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. einem gegen Gesamt-LGR5 (LGR5-Färbung) gerichteten Antikörper behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100μm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50μm.

Eine Verringerung der Zahl der LGR5-positiven Zellen oder eine Abschwächung der Färbintensität im Vergleich zur shKtr-Kontrolle kann in den immunhistochemischen Färbungen der SKLMS-1-Sphäroide mit dem anti-LGR5-Antikörper nach der Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 nicht beobachtet werden (Abb. 7.1). Dagegen nimmt nach lentiviraler Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide sowohl die Anzahl der LGR5-positiven Zellen als auch die Intensität der Färbung im Vergleich zur Kontrolle (LVKtr) in den SKLMS-1-Sphäroiden deutlich zu (Abb. 7.1).



**Abb. 3.20: Einfluss der veränderten LGR5-Expression auf die Sphäroidgröße.** Aufgetragen ist der Sphäroiddurchmesser bezogen auf die jeweilige Kontrolle (shKtr bzw. LVKtr), welche auf 100 % gesetzt ist. Der Durchmesser der Sphäroide wurde an drei Stellen im Abstand von ca. 60° mit Hilfe des Grafikprogramms Photoshop bestimmt und daraus ein Mittelwert gebildet. Mit \* ist eine signifikante Veränderung ( $p \leq 0,05$ ) des Sphäroiddurchmessers im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle (shKtr bzw. LVKtr) gekennzeichnet. [ $n=3$  (drei unabhängige Versuche)]. Je Versuch und Probe wurden 20 Sphäroide ausgemessen. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion der LGR5-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Statistische Analyse s. Kap. 2.2.4. Die Standardabweichungen der Kontrollen beträgt für SKLMS-1 shKtr 2,4 %, SKLMS-1 LVKtr 1,2 %; HaCaT shKtr 5 %; HaCaT LVKtr 3 %; MCF-7 shKtr 3 %; MCF-7 LVKtr 1 %.

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT bildet in der 3D-Kultur regelmäßige, runde und kompakte Sphäroide mit einer klaren äußeren Begrenzung, welche von einer Korona von Einzelzellen und Mehrzellaggregaten umgeben sind (Abb. 7.4). Die Reduktion der LGR5-Expression mittels des shRNA-Konstrukts shRNA1 hat im Vergleich zu der Kontrolle shKtr eine Verkleinerung der gebildeten Sphäroide um ca. 50 % ( $p=0,001$ ) zur Folge (Abb. 3.20), während sich die Korona aus Einzelzellen und Mehrzellaggregaten ausweitet. Das shRNA-Konstrukt shRNA2 hat keinen Einfluss auf die Sphäroidbildung der HaCaT-Zellen. Die Transduktion des LGR5FL-Expressionsplasmids führt in der Zelllinie HaCaT zur Verringerung der Sphäroidgröße um ca. 25 % ( $p=0,0004$ ) im Vergleich zur Leervektorkontrolle LVKtr (Abb. 3.20). Die Transduktion des LGR5Δ5-Expressionsplasmids hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sphäroidgröße. In den HE-Färbungen der HaCaT-Sphäroide erscheint nach Transduktion der shRNAs und LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide die innere Sphäroidstruktur im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (shKtr und LVKtr), welche eine sehr

kompakte Strukturierung des Sphäroidinneren aufweisen, leicht aufgelockert. In der immunhistochemischen Färbung der HaCaT Sphäroide mit dem anti-LGR5-Antikörper kann weder in den Kontrollen (shKtr und LVKtr) noch nach Transduktion der shRNA1 und shRNA2 LGR5-positive Zellen beobachtet werden. (Abb. 7.4). Nach lentiviraler Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide in dieser Zelllinie sind dagegen LGR5-positive Zellen nachweisbar (Abb. 7.4). Sowohl die Reduktion der *LGR5*-Expression durch die shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 und der Kolonkarzinomzelllinie HT29 als auch die Transduktion der LGR5FL- oder LGR5Δ5-Expressionsplasmide in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 haben keinen Einfluss auf die Sphäroidgröße und -struktur (Abb. 7.2; Abb. 7.3).

Zusammenfassend begünstigt eine Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 und teilweise shRNA2 in den Zelllinien RD, SKLMS-1, HaCaT und MCF-7 eine Lockerung der Sphäroidstruktur. Die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide hat in den Zelllinien MCF-7 und HaCaT deutliche Auswirkungen auf die Sphäroidbildung. In den Zelllinien SKBR3 und HT29 bleibt die Sphäroidbildung durch eine veränderte *LGR5*-Expression unbeeinflusst.

### 3.12 Microarray Analysen

Im Weiteren sollte untersucht werden, welche Gene durch LGR5 beeinflusst werden. Hierzu wurden Microarray-Untersuchungen in drei Zelllinien (RD, MCF-7 und HT29) sowohl nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA1 und shRNA2 als auch nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide durchgeführt. Es sollten mRNAs identifiziert werden, deren Gehalt durch die Transduktion der o. g. Expressionsplasmide verändert wird. In den Zelllinien HT29 und MCF-7 wurden Microarray-Analysen nach Modulation der *LGR5*-Expression mittels der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2, nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide und in den entsprechenden Kontrollen shKtr und LVKtr durchgeführt. In der Weichteilsarkomzelllinie RD wurde die Genexpression nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA1 und shRNA2 sowie in der entsprechenden Kontrolle shKtr analysiert.

**Tabelle 3.1: Anhand von Microarray-Analyse ausgewählte Gene.**

Gensymbol	NCBI Nr.	Definition
<b><i>DKK1</i></b>	NM_012242.2	dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
<b><i>SERPINE2</i></b>	NM_006216.2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 2), member 2
<b><i>CEACAM1</i></b>	NM_001024912.1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein), transcript variant 2
<b><i>MMP7</i></b>	NM_002423.3	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
<b><i>PIR</i></b>	NM_001018109.1	pirin (iron-binding nuclear protein, transcript variant 2)
<b><i>CDKN1A</i></b>	NM_078467.1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), transcript variant 1
<b><i>TFF3</i></b>	NM_003226.2	trefoil factor 3 (intestinal)

Bei der Auswertung der Microarray-Daten wurden zunächst die gemessenen Signale der Probe (Transduktion der shRNAs sowie der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide) auf die entsprechenden Kontrollen (shKtr bzw. LVKtr) bezogen:  $\text{Signal (Probe)}/\text{Signal (Kontrolle)} = \text{fold change}$  und davon der  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  gebildet. Die dabei erhaltenen logarithmischen *fold changes* zeigen, wie stark und in welche Richtung der mRNA-Gehalt des jeweiligen Gens in der Probe im Vergleich zur Kontrolle verändert ist. Alle mRNAs, deren logarithmischer *fold change*  $\leq -1$  ist, wurden als vermindert und alle mRNAs, deren logarithmischer *fold change*  $\geq 1$  ist, wurden als verstärkt vorhanden definiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7.21–7.28 dargestellt. Aus dieser Auflistung wurden sieben Gene ausgewählt (Tabelle 3.1), deren mRNA-Gehalt im Folgenden nach Transduktion der shRNAs und/oder LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide in den Zelllinien MCF-7, SKLMS-1, HaCaT, SKBR3, HT29, RD und SF767 mittels quantitativer Taqman-Echtzeit-PCR untersucht werden sollten. In diese Untersuchung wurden zusätzlich eine Reihe EMT- und Stammzellmarker einbezogen (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Tumor- und Stammzellmarker.**

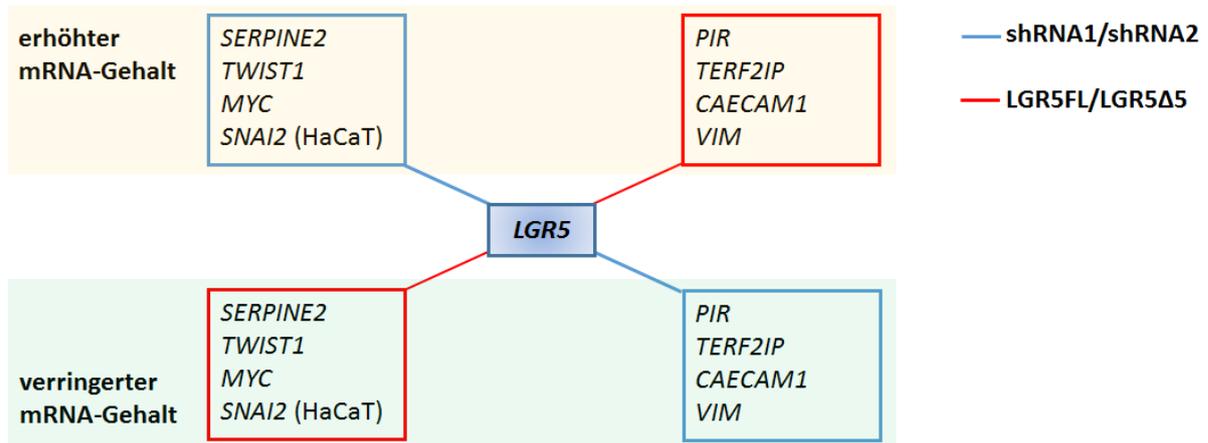
Gensymbol	NCBI Nr.	Definition
<b>ALDH1A2</b>	NM_000693.1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
<b>CCND1</b>	NM_053056.2	cyclin D1
<b>CDKN2B</b>	NM_004936.3	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (inhibits CDK4)
<b>MYC</b>	NM_002467.4	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>MDM2</b>	NM_001145337.2	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
<b>NANOG</b>	NM_024865.2	Nanog homeobox
<b>POU5F1 (OCT3/4)</b>	NM_001173531.1	POU class 5 homeobox 1
<b>PDGFB</b>	NM_002608.2	platelet-derived growth factor beta polypeptide
<b>RNF43</b>	NM_017763.4	ring finger protein 43
<b>SNAI2</b>	NM_003068.4	snail family zinc finger 2
<b>SOX2</b>	NM_003106.3	SRY (sex determining region Y)-box 2
<b>TCF7</b>	NM_001134851.2	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
<b>TERF2IP</b>	NM_018975.3	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
<b>TGFB1</b>	NM_000660.4	transforming growth factor, beta 1
<b>TWIST1</b>	NM_000474.3	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
<b>VIM</b>	NM_003380.3	Vimentin

### 3.13 Einfluss einer veränderten LGR5-Expression auf den mRNA-Gehalt ausgewählter EMT- und Stammzellmarker

Der mRNA-Gehalt ausgewählter Gene (Tabelle 3.1, Tabelle 3.2) nach Reduktion der LGR5-Expression durch die shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 sowie nach LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Überexpression durch die LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide wurde in den Zelllinien RD,

HT29, SF767, SKBR3, MCF-7, SKLMS-1 und HaCaT bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang zusammengestellt (Tabelle 7.10 - Tabelle 7.16).

Es zeigt sich, dass der mRNA-Gehalt der meisten untersuchten Gene durch die Modulation der *LGR5*-Expression nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus scheinen viele der untersuchten Gene in einem zelllinienspezifischen Kontext *LGR5*-abhängig reguliert zu werden. Dennoch ist der mRNA-Gehalt von acht Genen bei mehreren der untersuchten Zelllinien deutlich durch eine Modulation der *LGR5*-Expression verändert (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Gene deren mRNA-Gehalt nach Modulation der *LGR5*-Expression in der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien entgegengesetzt verändert ist.** shRNA1 und shRNA2 bezeichnet die Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 bzw. shRNA2 zur Reduktion *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide zur Steigerung der *LGR5*-Expression. Mit blauer Linie sind Gene umrandet, deren mRNA-Gehalt durch die shRNA1 und shRNA2 erhöht (gelb unterlegt) oder reduziert (grün unterlegt) wird. Mit roter Linie sind Gene umrandet, deren mRNA-Gehalt nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide gesteigert (gelb unterlegt) oder reduziert (grün unterlegt) wird.

Der mRNA-Gehalt von *SERPINE2*, *TWIST1* und *MYC* ist in mehreren der untersuchten Zelllinien nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels der shRNA1 und shRNA2 gesteigert und nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide verringert. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT ist der *TWIST1*-mRNA-Gehalt sowohl nach Transduktion der shRNAs als auch der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide erhöht. Dagegen ist der *SNAI2*-mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNAs erhöht und in den LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden HaCaT Zellen verringert (Tabelle 7.13). Der mRNA-Gehalt von *PIR*, *TERF2IP*, *CAECAM1* und Vimentin (*VIM*) ist nach Transduktion der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 in mehreren Zelllinien reduziert. Dagegen hat die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide einen erhöhten mRNA-Gehalt dieser Gene zur Folge. Auffallend ist hierbei, dass der mRNA-Gehalt der Gene *PIR* und *TERF2IP* nur nach Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 signifikant reduziert ist.

Neben diesen bei mehreren Zelllinien auffallend beeinflussten Genen ist die Expression einiger weiterer Gene zelltypspezifisch durch die Modulation der *LGR5*-Expression beeinflusst. So bewirkt die Transduktion des LGR5Δ5-Expressionsplasmids in der Zelllinie MCF-7 eine signifikante Reduktion des *TGFβ*-mRNA-Gehalts um 25 % ( $p=0,02$ ). Die Transduktion des LGR5FL-

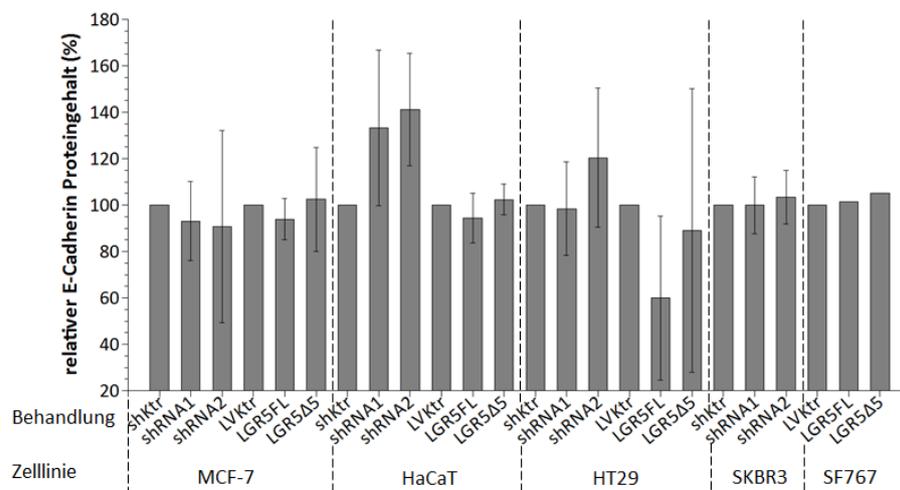
Expressionsplasmids führt zu einer nicht signifikanten Reduktion des *TGFβ*-mRNA-Gehalt um ebenfalls ca. 24 % ( $p=0,08$ ) (Tabelle 7.16). Die Transduktion der MCF-7 Zellen mit dem shRNA-Konstrukt shRNA1 erhöht den *TGFβ*-mRNA-Gehalt um 135 % ( $p=0,08$ ) und mit dem shRNA-Konstrukt shRNA2 um 16 % ( $p=0,66$ ). In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 hat die Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNAs einen starken, jedoch nicht signifikanten Anstieg des *NANOG*-mRNA-Gehalts zur Folge, während nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide der mRNA-Gehalt von *NANOG* verringert ist (Tabelle 7.11). In der Weichteilsarkomzelllinie SKLMS-1 ist der mRNA-Gehalt von *MMP7* nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA2 um 40 % ( $p=0,03$ ) und mittels shRNA1 um 60 % ( $p=0,2$ ) reduziert (Tabelle 7.12). Weiterhin ist in dieser Zelllinie eine Reduktion des OCT3/4-mRNA-Gehalts nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA1 um 40 % ( $p=0,04$ ) und durch shRNA2 um 30 % ( $p=0,01$ ) sowie nach Transduktion des LGR5FL-Expressionsplasmids um 40 % (LGR5FL;  $p=0,4$ ) bzw. des LGR5Δ5-Expressionsplasmids um 70 % (LGR5Δ5;  $p=0,09$ ) zu beobachten. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT ist der mRNA-Gehalt von *DKK1*, *MDM2*, *PDGFB* und *TGFβ* nach der Transduktion der shRNAs teilweise signifikant reduziert und nach Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide teilweise signifikant erhöht (Tabelle 7.13). Weiterhin steigt in dieser Zelllinie der *SNAI2*-mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 bzw. shRNA2 um rund 150 % ( $p=0,12$  bzw.  $p=0,1$ ) während die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide in einem um 50 % verminderten ( $p=0,24$  bzw.  $p\leq 0,01$ ) *SNAI2*-mRNA-Gehalt resultiert. Dagegen ist der *TWIST1*-mRNA-Gehalt in den HaCaT-Zellen sowohl nach Transduktion der shRNAs als auch der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide erhöht. Im Gegensatz zu der Zelllinie HaCaT resultiert in den Zelllinien RD, HT29, SKBR3 und MCF-7 eine Reduktion der *LGR5*-Expression in einer Steigerung des mRNA-Gehalts von *TWIST1* und die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide geht in den Zelllinien MCF-7 und SF767 mit einer Reduktion des *TWIST1*-mRNA-Gehalts einher. Der *SNAI2*-mRNA-Gehalt dieser Zelllinien (RD, HT29, SKBR3 und MCF-7) wird dagegen durch die Modulation der *LGR5*-Expression nicht signifikant bzw. deutlich beeinflusst. In der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 hat die Transduktion des shRNA-Konstrukts shRNA1 eine Reduktion des *TGFβ*-mRNA-Gehalts um 40 % ( $p=0,06$ ) zur Folge, während das shRNA-Konstrukt shRNA2 den *TGFβ*-mRNA-Gehalt um 50 % ( $p=0,03$ ) reduziert (Tabelle 7.14). In der Weichteilsarkomzelllinie RD wird der mRNA-Gehalt von *ALDH1A2* nach der Transduktion der shRNA1 um 235 % ( $p=0,07$ ) und der shRNA2 um 188 % ( $p=0,09$ ) erhöht (Tabelle 7.10). Darüber hinaus steigt in den RD-Zellen der mRNA-Gehalt von *TFF3* nach der Reduktion der *LGR5*-Expression durch das shRNA Konstrukt shRNA1 um 400 % ( $p=0,08$ ) an, während das shRNA Konstrukt shRNA2 eine Steigerung des *TFF3*-mRNA-Gehalts um 160 % bewirkt. In der Glioblastomzelllinie SF767 führt die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmide jeweils zu leichten Veränderungen des mRNA-Gehalts von *MDM2*, *SNAI2* und *TWIST1*.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der mRNA-Gehalt von acht Genen (*SERPINE2*, *TWIST1*, *MYC*, *CAECAM1*, *PIR*, *SNAI2* und *VIM*) durch die Modulation der *LGR5*-Expression deutlich verändert

ist. Der mRNA-Gehalt von *TGF $\beta$* , *NANOG*, *MMP7*, *OCT3/4*, *DKK1*, *MDM2*, *PDGFB*, *ALDH1A2* und *TFF3* ist im Gegensatz dazu nach Modulation der *LGR5*-Expression zelllinienabhängig verändert. Der *TGF $\beta$* -mRNA-Gehalt ist beispielsweise in den Zelllinien MCF-7 und RD nach Reduktion der *LGR5*-Expression erhöht, in der Zelllinie HaCaT dagegen reduziert.

### 3.14 Gehalt ausgewählter Proteine nach Modulation der *LGR5*-Expression

Im Weiteren sollte der Proteingehalt der Gene, deren mRNA-Gehalt durch die Modulation der *LGR5*-Expression deutlich beeinflusst wird, (Abb. 3.21) mithilfe der Western Blot-Analyse bestimmt werden.



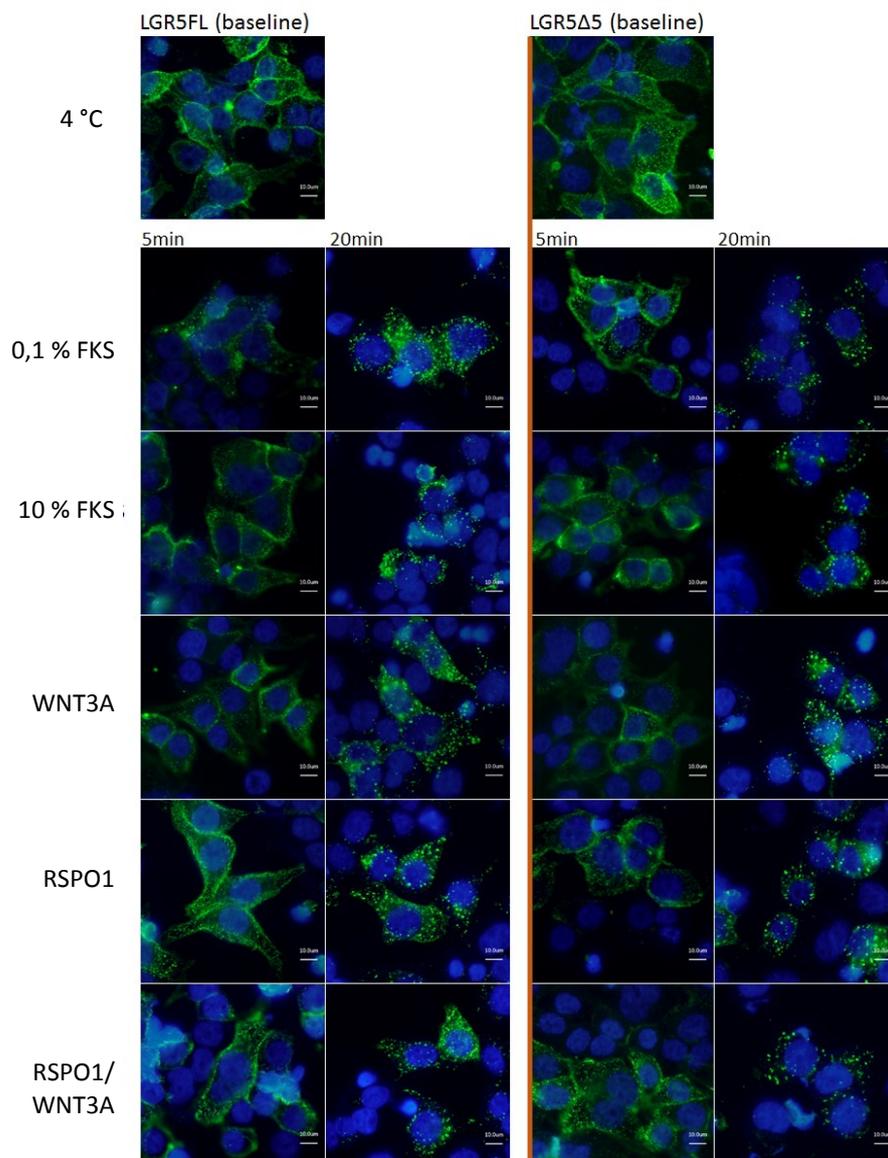
**Abb. 3.22: Analyse des Proteingehalts von E-Cadherin nach Modulation der *LGR5*-Expression in verschiedenen Zelllinien.** Für die Western Blot-Analyse wurden 30  $\mu$ g Gesamtproteinlysate eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels eines E-Cadherin-spezifischen Antikörpers.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die sekundären Antikörper waren fluoreszenzmarkiert. Die Messung erfolgte densitometrisch am Licor Scanner. Für die Auswertung wurden die Messwerte für E-Cadherin auf die zugehörigen  $\beta$ -Aktin Messwerte normiert. Die Signalhöhe der Kontrollen (shKtr bzw. LVKtr) wurde auf 100 % gesetzt und die Messwerte der Behandlungen auf die zugehörigen Kontrollen bezogen. (n=3). Statistische Analyse s. Kap. 2.4.4.

Als limitierender Faktor der Untersuchungen stellten sich die Spezifität und die Sensitivität der jeweils verwendeten Antikörper heraus. Mit Ausnahme von Vimentin konnten die untersuchten Proteine in Western Blot-Analysen nicht mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen wurde daher ein EMT-Antikörper-Kit der Firma Cell Signaling verwendet. Die Proteine ZO-1 und  $\beta$ -Catenin wurden in allen sieben Zelllinien, Vimentin nur in Zelllinien mesenchymalen Ursprungs (RD und SKLMS-1) und E-Cadherin nur in Zellen epithelialen Ursprungs (MCF-7, HT29, HaCaT und SF767) detektiert. Zwischen den einzelnen Versuchen waren jedoch hohe Schwankungen zu konstatieren, sodass bei der densitometrischen Auswertung keine eindeutigen Aussagen über den Einfluss der Modulation der *LGR5*-Expression auf den Proteingehalt von ZO-1, Vimentin, E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin getroffen werden konnten. Als Beispiel ist in Abbildung 3.22 der Proteingehalt des Adhäsionsproteins E-Cadherin nach Transduktion der shRNAs sowie der *LGR5FL*- bzw. *LGR5 $\Delta$ 5*-Expressionsplasmide in den Zelllinien MCF-7, HaCaT, HT29, SKBR3 und SF767 dargestellt. In der Zelllinie HaCaT resultiert die Reduktion der *LGR5*-Expression mittels

der shRNA-Konstrukte shRNA1 und shRNA2 in einem erhöhten E-Cadherin Proteingehalt. In der Zelllinie HT29 führt die Transduktion der LGR5FL- und LGR5 $\Delta$ 5-Expressionsplasmide zu einer Reduktion und die Transduktion der shRNA1 zu einem Anstieg des E-Cadherin Proteingehalts. Aufgrund der hohen Standardabweichungen sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch schwer zu werten.

### 3.15 Die Internalisierung von LGR5FL und LGR5 $\Delta$ 5

#### 3.15.1 Internalisierung in Abhängigkeit von der Zeit und der Art der Stimulation



**Abb. 3.23:** Zeitliche und stimulanzenabhängige Internalisierung des überexprimierten LGR5FL und der LGR5-Spleißvariante  $\Delta$ 5 in HEK293T-Zellen. Die vitalen Zellen wurden mit einem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper bei 4 °C inkubiert und anschließend entweder sofort fixiert (4 °C, *baseline*) oder für fünf bzw. 20 min bei 37 °C im Kulturmedium ohne (0 % FKS) oder mit Zusatz von Stimulanzen (10 % FKS, 150 ng/ml WNT3A, 150 ng/ml RSPO1 und RSPO1+WNT3A(150 ng/ml)) inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.

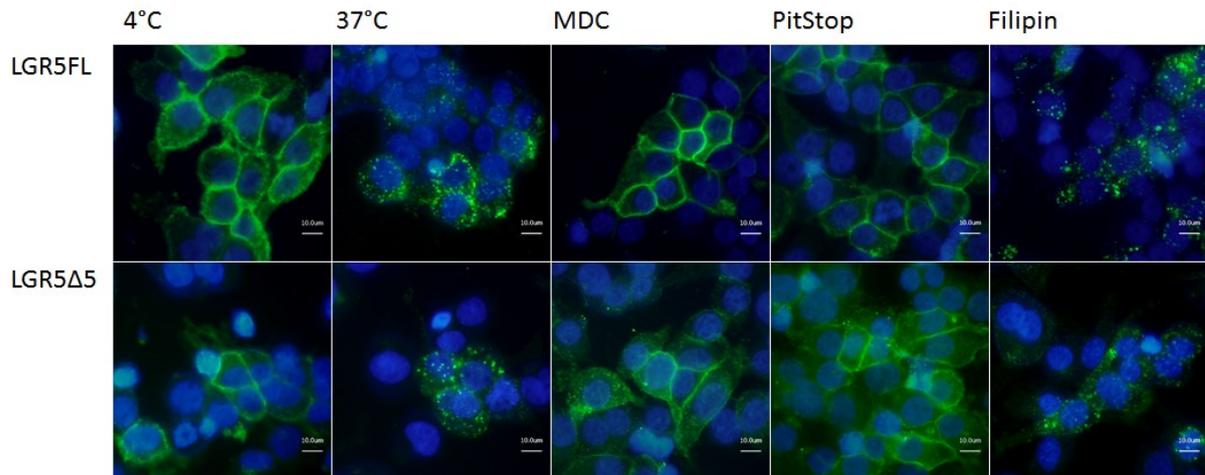
Bei der Untersuchung der zellulären Lokalisation des überexprimierten LGR5FL und LGR5Δ5 (Kap.3.6) konnte das überexprimierte Protein nur in Vesikelstrukturen innerhalb der Zelle, jedoch nicht auf der Zellmembran detektiert werden. Daher sollten im Weiteren die Membranlokalisation und die Internalisierungsvorgänge des LGR5FL und der Spleißvariante LGR5Δ5 untersucht werden. Aus methodischen Gründen wurde für die Internalisierungsuntersuchungen die Zelllinie HEK293T herangezogen. Die *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T-Zellen wurden für 16 h in Kulturmedium (RPMI) ohne Zusätze (0,1 % FKS) oder in Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FKS oder 150 ng/ml WNT3A oder 150 ng/ml RSPO1 sowie der Kombination aus WNT3A und RSPO1 kultiviert. Anschließend wurden die überexprimierten, Myc-Tag-gekoppelten LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteine auf der Zelloberfläche mit einem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper markiert (Kap.2.2.1.3; 2.2.1.4). Wurden die Zellen nach der Antikörperinkubation bei 4 °C (Markierung des membranständigen, Myc-Tag-gekoppelten LGR5FL bzw. LGR5Δ5) sofort fixiert (*baseline*), so kann eine deutliche Membranlokalisation des LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteins beobachtet werden (Abb. 3.23). Dabei sind die Fluoreszenzsignale in Spots über die Zellmembran verteilt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C bleibt das Bild im Vergleich zur *baseline* weitgehend unverändert, die Fluoreszenzsignale sind überwiegend in Spots auf der Zellmembran lokalisiert. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei 37 °C ist das gesamte fluoreszenzmarkierte LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein von der Membran entfernt und in vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert.

Ein Einfluss der eingesetzten Stimulanzen auf die Internalisierungsrate und/oder -geschwindigkeit ist nicht festzustellen. So ist nach Inkubation im Kulturmedium (RPMI) ohne Zusätze (0,1 % FKS), nach Inkubation im Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FKS, 150 ng/ml WNT3A oder 150 ng/ml RSPO1 sowie nach simultaner Inkubation mit WNT3A und RSPO1 bei gleicher Inkubationszeit ein vergleichbares Bild zu beobachten. Die Internalisierung der LGR5 *full length* Variante und der Δ5 Spleißvariante erfolgt sowohl zeitlich als auch in Abhängigkeit der eingesetzten Stimulanzen vergleichbar (Abb. 3.23).

### 3.15.2 Inhibierung der Endozytosewege

Im Weiteren sollte untersucht werden, über welchen Endozytoseweg das LGR5FL- und LGR5Δ5-Protein internalisiert wird. Hierzu wurden die *LGR5FL* und *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T-Zellen mit den Inhibitoren der clathrinvermittelten Endozytose MDC und PitStop2 sowie dem Inhibitor der calveolinvermittelten Endozytose Filipin III inkubiert (Kap.2.2.1.5). In den nach der Färbung sofort fixierten Präparaten sind die fluoreszenzmarkierten, Myc-Tag-gekoppelten LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteine in Spots auf der Zellmembran lokalisiert (Abb. 3.24; 4 °C). Nach dreißigminütiger Inkubation im Kulturmedium mit 10 % FKS bei 37 °C ist eine vollständige Internalisierung des fluoreszenzmarkierten Proteins zu beobachten (Abb. 3.24; 37 °C). Durch die Inkubation mit MDC oder PitStop2 (Inhibitoren der clathrinvermittelten Endozytose) kann diese Internalisierung vollständig blockiert werden (Abb. 3.24; MDC, PitStop). So ist nach einer

dreißigminütigen Inkubation mit MDC oder PitStop2 bei 37 °C das fluoreszenzmarkierte LGR5FL- und LGR5Δ5-Protein überwiegend an der Zellmembran lokalisiert.



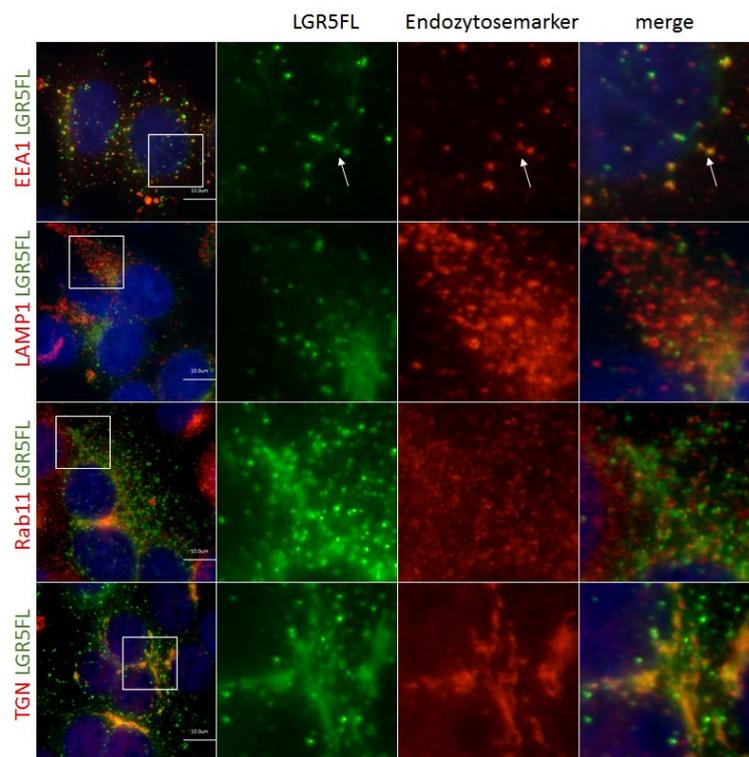
**Abb. 3.24: Inhibierung der clathrin- und calveolinvermittelten Endozytose des überexprimierten LGR5FL und LGR5Δ5 in HEK293T-Zellen.** Die Zellen wurden mit den Inhibitoren der clathrinvermittelten Endozytose (MDC, PitStop2) und mit dem Inhibitor der calveolinvermittelten Endozytose (FilipinIII) für 30 Minuten bei 37 °C behandelt oder als Kontrolle im Kulturmedium kultiviert (37 °C) und mit einem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper, welcher das an LGR5FL bzw. LGR5Δ5 gekoppelte Myc-Tag erkennt, bei 4 °C gefärbt und anschließend sofort fixiert (4°C) oder für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Transduktion der LGR5FL- bzw. LGR5Δ-Expressionsplasmide. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.

Dagegen hat die Inkubation mit Filipin III (Inhibitor der calveolinvermittelten Endozytose) keine Auswirkungen auf die Internalisierung der fluoreszenzmarkierten, Myc-Tag-gekoppelten LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteine. So liegen nach einer dreißigminütigen Inkubation mit Filipin III bei 37 °C die fluoreszenzmarkierten, Myc-Tag-gekoppelten LGR5FL- und LGR5Δ5-Proteine analog zu der Kontrolle (37°C) überwiegend internalisiert vor (Abb. 3.24, Filipin).

### 3.15.3 Untersuchung des Endozytosewegs von LGR5FL und LGR5Δ5

Über die Inhibierung der Endozytosewege (Kap. 3.15.2) wurde festgestellt, dass die Internalisierung von LGR5FL und LGR5Δ5 über die clathrinvermittelte Endozytose vermittelt wird. Anschließend soll der weitere Transportweg des LGR5FL und LGR5Δ5 in der Zelle untersucht werden sowie die Frage geklärt werden, inwieweit sich der Zusatz verschiedener Stimuli auf diesen Transportweg auswirkt. Hierzu wurden die *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T-Zellen entsprechend behandelt und das überexprimierte LGR5FL bzw. LGR5Δ5 sowie verschiedene Endozytosekompartimenten sichtbar gemacht. Die Markierung der frühen Endosome erfolgte über den Marker EEA1 (*Early endosome antigen 1*). Lysosome wurden durch den Marker LAMP1 (*Lysosome-associated membrane protein 1*), die Recyclingendosomen mittels des Markers Rab11 (*small Ras-like GTPase 11*) und das Trans-Golgi mithilfe des Markers TGN46 (*Trans-Golgi network protein (46 kDa)*) markiert. Zur Untersuchung der Internalisierung wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden *pulse chase*-Experimente durchgeführt. Hier wurden die *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T Zellen, wie bereits beschrieben (Kap.2.2.1.3; 2.2.1.4; 2.2.3.3), vital

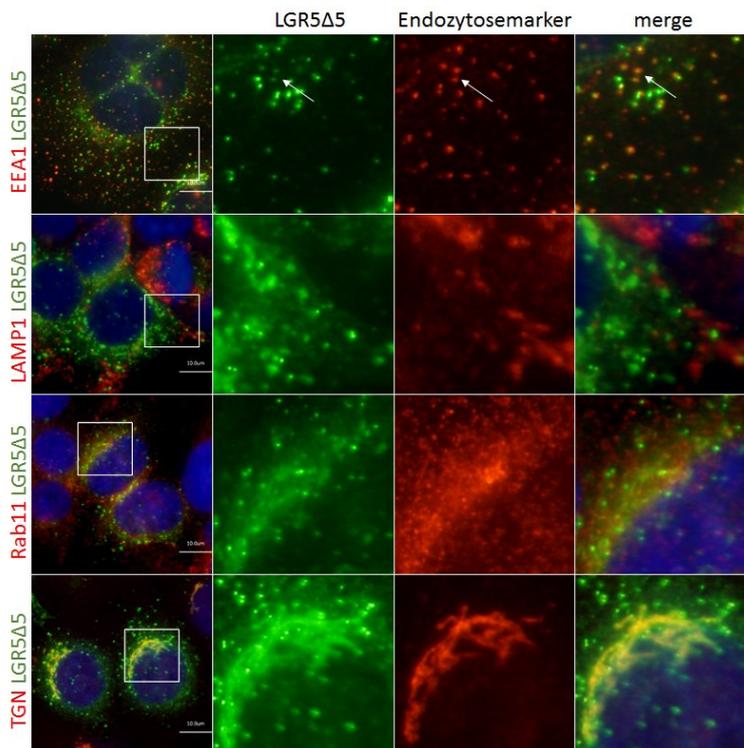
gefärbt (wobei das membranständige LGR5FL bzw. LGR5Δ5 markiert wird) und anschließend entweder sofort fixiert (0 Minuten) oder für 5, 15, 30 oder 120 Minuten im Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FKS bei 37 °C inkubiert. Zum anderen wurden die *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T Zellen für 16 h im Kulturmedium ohne Zusätze (0,1 % FKS) oder im Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FKS, 150 ng/ml WNT3A oder 150 ng/ml RSPO1 sowie der Kombination aus WNT3A und RSPO1 (150 ng/ml) kultiviert und anschließend fixiert. Die Färbung des LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteins erfolgte im Anschluss an die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (Kap. 2.2.3.3), wodurch das gesamte Myc-Tag gekoppelte LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein der Zellen angefärbt wurde.



**Abb. 3.25: Internalisierung von LGR5FL in *LGR5FL* überexprimierenden HEK293T-Zellen.** Die Zellen wurden im RPMI-Komplettmedium (10 % FKS) kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Es erfolgte jeweils eine Doppelfärbung mit einem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper, welcher das an LGR5FL gekoppelte Myc-Tag erkennt (LGR5FL/grün), und mit Antikörpern gegen die Marker für verschiedene Kompartimente des Endozytoseapparats (rot). EEA1: frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN: trans-Golgi. Der mit dem Viereck markierte Bereich der ersten Bildspalte stellt den nachfolgenden, vergrößerten Bereich dar. Unter LGR5FL ist der FITC-Kanal und unter Endozytosemarker der Cy3-Kanal einzeln dargestellt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung. merge zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle.

In den Präparaten, in denen das gesamte überexprimierte LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein angefärbt wurde, ist eine deutliche Co-Lokalisation zwischen LGR5FL bzw. LGR5Δ5 und den frühen Endosomen (EEA1) nachweisbar (Abb. 3.25; Abb. 3.26). Dabei hat der Zusatz von verschiedenen Stimuli (10 % FKS, WNT3A, RSPO1) keinen Einfluss auf die Translokation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in die frühen Endosomen (Abb. 7.5; Abb. 7.6). Eine Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in Lysosomen (LAMP1) ist nicht zu beobachten (Abb. 3.25; Abb. 3.26) – sowohl ohne als auch mit Zusatz von Stimuli (Abb. 7.5; Abb. 7.6). Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Farbkanäle (rot(LAMP1) und grün(LGR5FL bzw. Δ5)) kann zwar an Stellen mit hoher Fluoreszenzdichte beobachtet werden, jedoch sind bei der einzelnen Betrachtung der Kanäle keine Strukturen zu finden, welche in beiden Kanälen gleichermaßen vorhanden sind (Abb. 3.25; Abb. 3.26; Abb. 7.5; Abb. 7.6). Das gleiche gilt für die Co-Immunfärbung von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 und

den Recyclingendosomen (Rab11). Eine eindeutige Co-Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 und Rab11 ist weder ohne Stimulation noch nach Stimulation (10 % FKS, WNT3A, RSP01) zu beobachten (Abb. 3.25; Abb. 3.26; Abb. 7.5; Abb. 7.6). Zwischen LGR5FL bzw. LGR5Δ5 und TGN46 kann eine deutliche Co-Lokalisation beobachtet werden (Abb. 3.25; Abb. 3.26), was für eine Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in der trans-Seite des Golgi-Apparats spricht. Diese Lokalisation ist Stimuli-unabhängig (Abb. 7.5; Abb. 7.6). Hierbei kann jedoch nicht beurteilt werden, ob es sich um neusynthetisiertes oder internalisiertes/recyceltes LGR5FL bzw. LGR5Δ5 handelt, da bei dieser Färbung das gesamte Myc-gekoppelte LGR5FL bzw. LGR5Δ5 der Zelle angefärbt wurde.



**Abb. 3.26: Internalisierung von LGR5Δ5 in LGR5Δ5 überexprimierenden HEK293T-Zellen.** Die Zellen wurden im RPMI-Komplettmedium (10 % FKS) kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Es erfolgte jeweils eine Doppelfärbung mit einem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag Antikörper, welcher das an LGR5Δ5 gekoppelte Myc-Tag erkennt (LGR5Δ5/grün), und mit Antikörpern gegen die Marker für verschiedene Kompartimente des Endozytoseapparats (rot). EEA1: frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN: trans-Golgi-Apparat. Der mit dem Viereck markierte Bereich der ersten Bildspalte stellt den nachfolgenden, vergrößerten Bereich dar. Unter LGR5Δ5 ist der FITC-Kanal und unter Endozytosemarker der Cy3 Kanal einzeln dargestellt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung. merge zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle.

In den *pulse chase*-Experimenten ist zum Zeitpunkt 0 min das LGR5FL bzw. LGR5Δ5 wie bereits in Kap. 3.15.1 gezeigt an der Zellmembran in Spots lokalisiert (Abb. 7.7, Abb. 7.8). Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C verändert sich das Bild nur wenig. Eine Co-Lokalisation mit einem der untersuchten Endozytosekompartimente ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten (Abb. 7.7, Abb. 7.8). Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C wurde das membranständige LGR5FL bzw. LGR5Δ5 beinahe vollständig zu den frühen Endosomen (EEA1) transportiert (Abb. 7.7, Abb. 7.8). Nach 30 Minuten und 120 Minuten Inkubation ist das LGR5FL bzw. LGR5Δ5 vollständig internalisiert und es ist eine Co-Lokalisation mit frühen Endosomen (EEA1) nachweisbar. Dabei nimmt die Anzahl der frühen Endosomen, in denen LGR5FL bzw. LGR5Δ5 nachweisbar ist, mit der Zeit ab. Die Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in den Lysosomen (LAMP1), Recyclingendosomen (Rab11) oder trans-Golgi (TGN) kann zu keinem Zeitpunkt eindeutig festgestellt werden. Es lässt sich daher vermuten, dass es sich bei dem im trans-Golgi lokalisierten

LGR5FL bzw. LGR5Δ5, welches bei der Anfärbung des gesamten überexprimierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 der Zelle nachzuweisen ist (Abb. 7.7; Abb. 7.8), um neusynthetisiertes LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein handelt.

### 3.16 Prognostische und klinische Bedeutung von LGR5FL und dessen Spleißvariante LGR5Δ5

Die prognostische Relevanz der *LGR5*-Expression wurde für verschiedene Tumorentitäten gezeigt, wie z. B. Kolorektalkarzinome (Fan *et al.* 2010), Ovarialkarzinome (von Rahden, Burkhard H A *et al.* 2011), Lebertumore (Yamamoto *et al.* 2003) und Basalzellkarzinome (Tanese *et al.* 2008). Allerdings war die Bedeutung von LGR5 für die Prognose von Patienten mit Weichteilsarkomen (WTS) oder oralen Plattenepithelkarzinomen zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht. Darüber hinaus ist die prognostische Relevanz der LGR5-Spleißvariante LGR5Δ5 bisher in keiner Tumorentität untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit die Assoziation des tumoralen mRNA-Gehalts des *full length* LGR5 bzw. der LGR5 Spleißvariante LGR5Δ5 mit histopathologischen und klinischen Parametern von Patienten mit Weichteilsarkomen bzw. oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht.

#### 3.16.1 Klinische und prognostische Bedeutung des LGR5FL und LGR5Δ5 in

##### Weichteilsarkomen

Der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt wurde in 77 Weichteilsarkomproben durch quantitative Taqman-Echtzeit-PCR bestimmt und auf das *house keeping*-Gen *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), das als interne Kontrolle diente, bezogen. Die Ergebnisse wurden zum Gesamtüberleben und zu verschiedenen klinischen Parametern wie Stadium, Tumorart und Alter korreliert. Die Medianwerte der 77 untersuchten Weichteilsarkomproben lagen bei  $1,07 \times 10^{-5}$  ( $0-4,1 \times 10^{-3}$ ; Mittelwert  $2,3 \times 10^{-4}$ ) zmol *LGR5FL*-mRNA/Kopie *HPRT*-mRNA und  $7,6 \times 10^{-6}$  ( $0-6,4 \times 10^{-3}$ ; Mittelwert  $2,5 \times 10^{-4}$ ) zmol *LGR5Δ5*-mRNA/Kopie *HPRT*-mRNA. Für die Überlebensanalysen wurden die Weichteilsarkompatienten entsprechend des medianen *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts in zwei Gruppen eingeteilt (Tabelle 3.3; Tabelle 7.18).

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass die Patienten mit einem niedrigen *LGR5FL*-mRNA-Gehalt im Tumor im Durchschnitt 30 Monate ( $p=0,056$ ) bzw. die Patienten mit einem niedrigen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor im Durchschnitt 40 Monate ( $p=0,004$ ) früher verstarben als Patienten mit hohem tumoralem *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt (Tabelle 3.3). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, -lokalisierung, histologischem Typ und Resektionsgrad) wiesen die Patienten mit einem niedrigen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor ein um den Faktor 2,6 ( $p=0,026$ ) erhöhtes Risiko auf, zu versterben (Tabelle 3.3). Zusätzlich zeigt sich bei der Betrachtung des rezidivfreien Überlebens (Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs), dass ein niedriger *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor signifikant mit dem frühen Auftreten eines Rezidivs assoziiert ist ( $p=0,043$ ) (Tabelle 3.3). Außerdem lässt sich ein signifikanter Zusammenhang

zwischen dem mRNA-Gehalt des *LGR5Δ5* im Tumor und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Tumordiagnose feststellen. Patienten mit einem niedrigen tumoralen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt erkrankten im Durchschnitt 7,5 Jahre früher am Tumor als Patienten mit einem hohen tumoralen *LGR5Δ5* mRNA-Gehalt (61,4 vs. 53,9 Jahre;  $p=0,039$ ) (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Überleben und tumorassoziierte Parameter der WTS-Patienten.** Es sind das Überleben und die tumorassoziierte Parameter von WTS-Patienten entsprechend des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* im Tumorgewebe dargestellt. Die Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen erfolgte entsprechend des Medians des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5*. Die Normalisierung des *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) mRNA-Gehalt. Multivariate Cox-Regressionsanalyse adjustiert nach Tumorstadium, histologischem Subtyp, Tumorresektion und Tumorlokalisation. M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen; RR: relatives Risiko; \* $p \leq 0,05$  vs. Referenzgruppe; Mon.: Monate; KI: Konfidenzintervall.

Kategorie	Patientenzahl	<i>LGR5FL</i> -mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>HPRT</i>		<i>LGR5Δ5</i> -mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>HPRT</i>	
		$\leq 1,07 \cdot 10^{-5}$	$> 1,07 \cdot 10^{-5}$	$\leq 7,6 \cdot 10^{-6}$	$> 7,6 \cdot 10^{-6}$
<b>Messwerte</b>	77	0 – $4,1 \cdot 10^{-3}$		0 – $6,4 \cdot 10^{-3}$	
<b>Median</b>	77	$1,07 \cdot 10^{-5}$		$7,6 \cdot 10^{-6}$	
<b>Mittelwert</b>	77	$2,3 \cdot 10^{-4}$		$2,5 \cdot 10^{-4}$	
<b>Gesamt</b>	77	39	38	39	38
<b>Tumorgrad</b>		<b><math>p=0,023^*</math></b>		<b><math>p=0,005^*</math></b>	
I	10	1	9	0	10
II	33	21	12	21	12
III	26	12	14	13	13
IV	8	5	3	5	3
<b>Patientenüberleben</b>					
ja	36	15	21	13	23
nein	41	24	17	26	15
<b>Metastasen</b>		<b><math>p=0,291</math></b>		<b><math>p=0,025^*</math></b>	
M0	21	9	12	7	14
M1	29	17	12	19	10
<b>Diagnosealter</b>		<b><math>p=0,218</math></b>		<b><math>p=0,039^*</math></b>	
Alter (Mittelwert)		59,9	55,4	61,4	53,9
<b>Kaplan-Meier-Analyse</b>		<b><math>p=0,056</math></b>		<b><math>p=0,004^*</math></b>	
medianes Überleben(Mon.)		50,1	80,3	45,8	86,2
95 % KI		37,2-62,9	59,4-101,3	33,3-58,4	64,7-107,6
<b>Kaplan-Meier-Analyse</b>		<b><math>p=0,196</math></b>		<b><math>p=0,043^*</math></b>	
medianes, rezidivfreies Überleben(Mon.)		44,4	55,3	40,2	58,6
95 % KI		31-55,7	42,9-67,7	27,6-52,6	46,7-70,5
<b>Univariate Cox-Regression</b>		<b><math>p=0,06</math></b>		<b><math>p=0,006^*</math></b>	
RR		1,8		2,5	
95 % Konfidenzintervall		0,97-3,5		1,3-4,8	
<b>Multivariate Cox-Regression</b>		<b><math>p=0,12</math></b>		<b><math>p=0,026^*</math></b>	
RR		1,8		2,6	
95 % KI		0,9-4,0		1,1-6,0	

Eine signifikante Assoziation zwischen der Höhe des *LGR5FL*-mRNA-Gehalts im Tumor und dem Gesamt- oder rezidivfreien Überleben sowie dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ist nicht zu beobachten. In der univariaten Cox-Regression weist die Patientengruppe mit einem niedrigen tumoralen *LGR5FL*-mRNA-Gehalt ein um den Faktor 1,8 ( $p=0,06$ ) erhöhtes nicht signifikantes Risiko auf, zu versterben (Tabelle 3.3). Weiterhin wurde der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor mit weiteren klinischen Parametern korreliert. In einer bivariaten Analyse korreliert ein niedriger *LGR5FL*-mRNA-Gehalt im Tumor signifikant mit einem höheren Tumorgrad ( $p=0,02$ ). (Tabelle 3.3). Ein niedriger tumoraler mRNA-Gehalt der Spleißvariante *LGR5Δ5* zeigt ebenfalls eine signifikante Assoziation mit einem höheren Tumorgrad ( $p=0,005$ ) sowie mit dem Auftreten von Fernmetastasen ( $p=0,025$ ) (Tabelle 7.18). Dabei ist festzustellen, dass der durchschnittliche *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Primärtumor der Patienten ( $n=29$ ), welche Fernmetastasen bekamen, um den Faktor 6 geringer ist als bei den Patienten ( $n=21$ ), die keine Metastasen aufwiesen ( $6,9 \times 10^{-5}$  vs.  $4,3 \times 10^{-4}$  zmol *LGR5Δ5*-mRNA/Kopie *HPRT*-mRNA).

### 3.16.2 Klinische und prognostische Bedeutung des *LGR5FL* und *LGR5Δ5* in oralen

#### Plattenepithelkarzinomen

Der mRNA-Gehalt von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* wurde in 69 oralen Plattenepithelkarzinomproben mittels quantitativer Taqman-Echtzeit-PCR vermessen und auf das *house keeping*-Gen *RPII* (RNA-Polymerase II), das als interne Kontrolle diente, bezogen. Die Ergebnisse wurden zum Gesamtüberleben und zu verschiedenen klinischen Parametern wie Tumorgrad und Tumorstadium korreliert. Die Medianwerte der 69 untersuchten Tumorproben lagen bei  $8,7 \times 10^{-6}$  ( $0,12$ – $238,2 \times 10^{-6}$ ; Mittelwert  $32,8 \times 10^{-6}$ ) zmol *LGR5FL*-mRNA/Kopie *RPII*-mRNA und  $10,2 \times 10^{-6}$  ( $0,12$ – $326,4 \times 10^{-6}$ ; Mittelwert  $31,4 \times 10^{-6}$ ) zmol *LGR5Δ5*-mRNA/Kopie *RPII*-mRNA. Für die Überlebensanalysen wurden die Tumorpatienten entsprechend des Medians des tumoralen *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts in zwei Gruppen unterteilt (Tabelle 3.4; Tabelle 7.17).

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich, dass Patienten mit einem hohen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor im Durchschnitt zehn Monate früher verstarben als Patienten mit einem niedrigen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumorgewebe (26 vs. 19 Monate,  $p=0,001$ ) (Tabelle 3.4). Weiterhin zeigt sich, dass ein hoher *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor signifikant mit dem frühen Auftreten eines Rezidivs assoziiert ist. Patienten mit einem hohen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor bekamen im Durchschnitt 20 Monate früher ein Rezidiv als Patienten mit einem niedrigen tumoralen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt (14 vs. 34;  $p=0,001$ ) (Tabelle 3.4). In einer univariaten Cox-Regressionsanalyse weist die Patientengruppe mit einem hohen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor ein 2,8fach erhöhtes relatives Risiko ( $RR=2,8$ ;  $p=0,002$ ) auf, am Tumor zu versterben (Tabelle 3.4). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorgrad, T-Status (Tumorgröße), N-Status (Lymphknotenmetastasen) und Geschlecht) weist die Patientengruppe mit einem hohen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor ein 2,7fach erhöhtes relatives Risiko ( $RR=2,7$ ;  $p=0,006$ ) (Tabelle 3.4) auf, am Tumor zu versterben. Der *LGR5FL*-mRNA-Gehalt weist keine signifikante prognostische

Relevanz für das Überleben und das Rezidivrisiko der Plattenepithelkarzinompatienten auf (Tabelle 3.4). Weiterhin wurde der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt mit weiteren klinischen Parametern korreliert. Es lässt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem mRNA-Gehalt von *LGR5Δ5* im Tumor und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen feststellen. Patienten mit einem hohen tumoralen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt wiesen häufiger Lymphknotenmetastasen auf als Patienten mit einem niedrigen tumoralen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt (24 vs. 15;  $p=0,02$ ) (Tabelle 3.4).

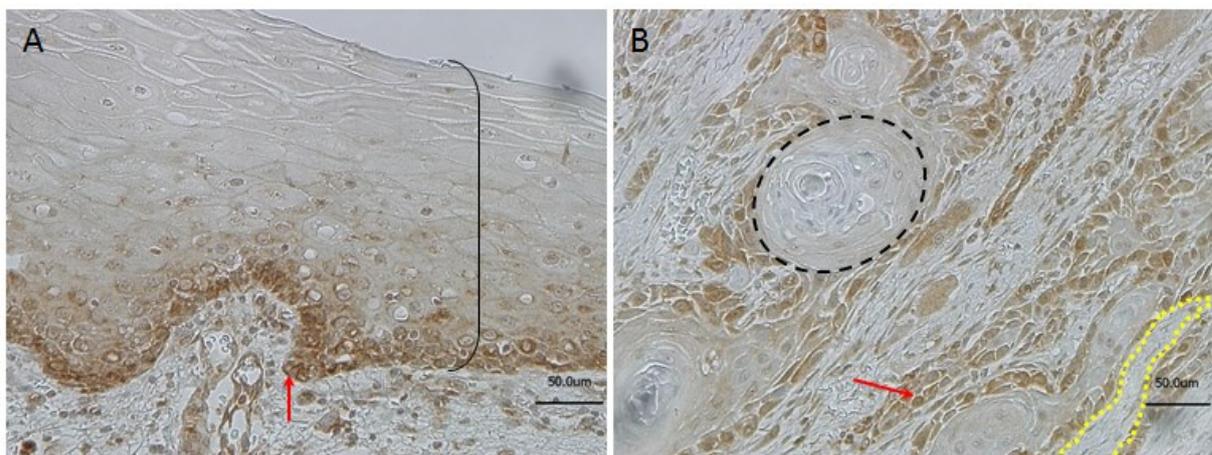
**Tabelle 3.4: Überleben und tumorassoziierte Parameter der Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom.** Es sind das Überleben und tumorassoziierte Parameter von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle entsprechend des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* dargestellt. Die Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen erfolgte entsprechend des Medians des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5*. Die Normalisierung des *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts erfolgte zum *RPII* (RNA-Polymerase II) mRNA-Gehalt. Multivariate Cox-Regressionsanalyse adjustiert nach Tumorgrad, T-Status (Tumorgröße), N-Status (Lymphknotenmetastasen) und Geschlecht. N0: keine Lymphknotenmetastasen; N1: Lymphknotenmetastasen; RR: relatives Risiko; \*  $p \leq 0,05$  und vs. Referenzgruppe; Mon.: Monate; KI: Konfidenzintervall

Kategorie	Patientenzahl	<i>LGR5FL</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>RPII</i>		<i>LGR5Δ5</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>RPII</i>	
		$\leq 8,7 \cdot 10^{-6}$	$> 8,7 \cdot 10^{-6}$	$\leq 10,2 \cdot 10^{-6}$	$> 10,2 \cdot 10^{-6}$
<b>Messwerte</b>	69	0,12–238,2x10 <sup>-6</sup>		0,12–326,4x10 <sup>-6</sup>	
<b>Median</b>	69	8,7x10 <sup>-6</sup>		10,2x10 <sup>-6</sup>	
<b>Mittelwert</b>	69	32,8x10 <sup>-6</sup>		31,4x10 <sup>-6</sup>	
<b>Gesamt</b>	69	35	34	35	34
<b>Patientenüberleben</b>					
ja	26	15	11	18	8
nein	43	20	23	17	26
<b>Lymphknotenmetastasen</b>		p=0,387		p=0,02*	
N0	30	17	13	20	10
N1	39	18	21	15	24
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>					
medanes Überleben(Mon.)		p=0,24		p=0,001*	
95 % KI		23,7	19,9	26,9	16,9
		28,1-19,2	24,3-15,5	31,1-22,7	21-12,9
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>					
medanes, rezidivfreies Überleben(Mon.)		p=0,20		p=0,001*	
95 % KI		26,7	22,3	34,3	14,9
		33,1-20,3	29,2-15,5	41,4-27,3	19,2-10,6
<b>Univariate Cox Regression</b>					
RR (relatives Risiko)		p=0,251		p=0,002*	
95 % KI		1,4		2,8	
		0,77-2,73		1,45-5,58	
<b>Multivariate Cox-Regression</b>					
RR (relatives Risiko)		p=0,13		P=0,006*	
95 % KI		1,6		2,7	
		0,84-3,3		1,33-5,78	

In weiteren bivariaten Analysen kann eine Korrelation zwischen der Höhe des tumoralen *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts und der Höhe des tumoralen mRNA-Gehalts einiger tumorassoziiierter Gene gezeigt werden (Tabelle 7.19). Die Höhe des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* im

Tumorgewebe korreliert signifikant positiv (d. h. je höher der mRNA-Gehalt von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* desto höher der mRNA-Gehalt der korrelierenden Gene) mit der Höhe des tumoralen mRNA-Gehalts der EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren *TCF7*, *TWIST1* und *SNAI1*, dem EMT-Marker Vimentin sowie mit der Metalloprotease 7 (*MMP7*), dem Cytochrom 1B1 (*CYP1B1*) und Cyclin D1 (*CCND1*). Die Höhe des tumoralen mRNA-Gehalts von *LGR5FL* korreliert weiterhin positiv mit der Höhe des tumoralen mRNA-Gehalts der drei Osteopontin Spleißvarianten (*OPNa*, *OPNb*, *OPNc*), der Carboanhydrase 2 (*CA2*) und den Stammzellmarkern *NANOG* und *OCT3/4*. Das Verhältnis der Höhe des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* zu *LGR5Δ5* (*LGR5FL/LGR5Δ5*) im Tumor korrelierte ebenfalls mit der Höhe des tumoralen mRNA-Gehalts mehrerer Tumormarker. Liegt in der Tumorprobe mehr *LGR5FL*- als *LGR5Δ5*-mRNA vor, so korreliert dies mit einem erhöhten tumoralen mRNA-Gehalt der Hypoxiemarker Carboanhydrase (*CA9*) und *VEGF* sowie mit einem erhöhten mRNA-Gehalt von *HER2*, *EGFR*, *CD44*, *SOX2*, *RNF43* und E-Cadherin (*CDH1*), während der tumorale mRNA-Gehalt von *SNAI1*, *hCCL8* und Survivin verringert ist (Tabelle 7.19).

Im Weiteren wurde das LGR5-Protein im gesunden Plattenepithel der Mundhöhle sowie in den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle mittels immunhistochemischer Färbungen mit dem anti-LGR5-Antikörper nachgewiesen. Der anti-LGR5 Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des LGR5 gerichtet und erkennt alle drei LGR5-Varianten (*full length*,  $\Delta 5$  und  $\Delta 8$ ). Im gesunden unverhornten Plattenepithel (Normalgewebe aus der Umgebung eines Tumors) (Abb. 3.27A) sind LGR5-positive Zellen hauptsächlich in der untersten Epithelschicht (*stratum basale*) zu finden.



**Abb. 3.27: Immunhistochemische Färbung des LGR5 Proteins im gesunden, unverhornten Plattenepithel der Mundhöhle (A) und im oralen Plattenepithelkarzinom (B).** Schnitte der in Paraffin eingebetteten Tumorstücke wurden mit dem anti-LGR5-Antikörper (gegen LGR5 *full length*,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 8$  gerichtet) gefärbt. **A.** Unverhorntes Plattenepithel (mit Klammer markiert). Hier beschränkt sich die LGR5-Färbung (roter Pfeil) hauptsächlich auf die unterste Zellschicht (*stratum basale*). **B.** Tumorgewebe. Die schwarze Strichlinie umrandet einen für Plattenepithelkarzinome charakteristischen Verhornungsbereich. Die gelbe Strichlinie umfasst das Stroma. LGR5-positiv (roter Pfeil) sind hauptsächlich undifferenzierte Tumorzellen, welche diffus über das Gewebe verteilt sind.

In dieser Epithelschicht befinden sich Stammzellen, welche für die Erneuerung der Haut/Schleimhaut verantwortlich sind. In den weiter oben liegenden Epithelschichten befinden sich die ausdifferenzierten Hautzellen (*stratum intermedium*). In der obersten Epithelschicht gehen die

Zellen unter Verlust des Zellkerns zugrunde und bilden das *stratum superficiale*. Die Intensität der LGR5-Färbung nimmt im gesunden Plattenepithel mit steigendem Differenzierungsgrad ab (Abb. 3.27A). Das Plattenepithelkarzinom imitiert histologisch das gesunde Plattenepithel. Es sind sog. Verhornungsbereiche innerhalb des Tumorgewebes (Abb. 3.27B) zu finden. Diese werden durch ausdifferenzierte und unter Verlust des Zellkerns abgestorbene Tumorzellen gebildet. Die LGR5-positiven Zellen im Plattenepithelkarzinom sind hauptsächlich unter undifferenzierten Tumorzellen zu finden. Auch hier nimmt die Intensität der LGR5-Färbung mit zunehmendem Differenzierungsgrad im Plattenepithelkarzinom ab (Abb. 3.27B).

## 4. Diskussion

### 4.1 *LGR5*-mRNA-Gehalt verschiedener Zelllinien

Bei der Charakterisierung verschiedener Tumorzelllinien hinsichtlich ihres *LGR5*-mRNA-Gehaltes ist in allen untersuchten Zelllinien *LGR5*-mRNA nachweisbar (Abb. 3.1). Die Höhe des *LGR5*-mRNA-Gehalts variiert jedoch sehr stark zwischen den Zelllinien. Während die immortalisierten Keratinozyten (HaCaT-Zelllinie) nur sehr wenig *LGR5*-mRNA aufweisen, ist der *LGR5*-mRNA-Gehalt in Tumorzelllinien wie der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 und der Weichteilsarkomzelllinie RD deutlich höher. Darüber hinaus besteht kein Zusammenhang zwischen der Tumorentität und dem *LGR5*-mRNA-Level. So ist der *LGR5*-mRNA-Gehalt der Kolorektalkarzinomzelllinie HT29 hoch, während der *LGR5*-mRNA-Gehalt der Kolorektalkarzinomzelllinie HCT116 niedrig ist. Lediglich in den Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms (FADU, SAS, CAL33 und XF343) ist einheitlich ein niedriger *LGR5*-mRNA-Level zu verzeichnen.

*LGR5* wurde ursprünglich als Marker für adulte Stammzellen des Darmepithels identifiziert (Barker *et al.* 2007). In einer Reihe von Arbeiten wurde eine erhöhte *LGR5*-Expression in Tumoren bzw. Tumorzelllinien und im Vergleich dazu eine niedrige *LGR5*-Expression im entsprechenden Normalgewebe aufgezeigt (Chen *et al.* 2014a; Fan *et al.* 2010; Sun *et al.* 2015). Für die Zelllinie HaCaT, bei der es sich um humane, immortalisierte Keratinozyten aus der Peripherie eines Melanoms handelt (Boukamp *et al.* 1988), wurde eine sehr niedrige *LGR5*-Expression nachgewiesen (Tanese *et al.* 2008). Die eigenen Analysen weisen analog dazu für die Zelllinie HaCaT ebenfalls den niedrigsten *LGR5*-mRNA-Level unter den untersuchten Zelllinien auf (Abb. 3.1). Eine deutliche *LGR5*-Expression wurde für verschiedene Kolon-, Leber-, Zervix-, Ovarial- und Lungenkarzinomzelllinien gezeigt. Dabei variierte die Höhe der *LGR5*-Expression unter den einzelnen Zelllinien stark (McClanahan *et al.* 2006; Uchida *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014a; Yamamoto *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Kolonkarzinomzelllinien, welche von Tumormetastasen abstammen, einen höheren *LGR5*-mRNA-Gehalt aufwiesen als Kolonkarzinomzelllinien, welche aus Primärtumoren etabliert wurden (Uchida *et al.* 2010). Zu den letzteren gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HCT116. Eine erhöhte *LGR5*-Expression in Tumoren und Tumorzelllinien wurden in der Literatur mit einer erhöhten Wnt-Aktivität bzw. Deregulation des Wnt-Signalweges in Verbindung gebracht (McClanahan *et al.* 2006; Yamanoi *et al.* 2013; Fan *et al.* 2010). So liegt in der Zelllinie HT29 eine Mutation im *APC*-Gen vor, welche eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges zur Folge hat. Die Zelllinie HCT116 weist ein Wildtyp-*APC*-Gen auf, hat jedoch eine heterozygote *in frame*-Deletion eines hochkonservierten Serins im  $\beta$ -Catenin-Gen. Diese Mutation wirkt dominant negativ und resultiert in einer erhöhten  $\beta$ -Catenin vermittelten transkriptionellen Aktivität (Ilyas *et al.* 1997). Die Weichteilsarkomzelllinien RD und LMS 6-93 sowie die Zelllinien SKBR3, LN229, Hela und SAOS-2 weisen in dieser Arbeit ebenfalls einen hohen *LGR5*-mRNA-Gehalt auf. Informationen über eine konstitutive Aktivierung des  $\beta$ -Catenin abhängigen Wnt-Signalwegs in diesen Zelllinien waren in der Literatur jedoch nicht zu finden. Yamamoto und Kollegen vermuteten in diesem Zusammenhang die

Existenz weiterer vom kanonischen Wnt-Signalweg unabhängiger Faktoren, welche die *LGR5*-Expression regulieren (Yamamoto *et al.* 2003).

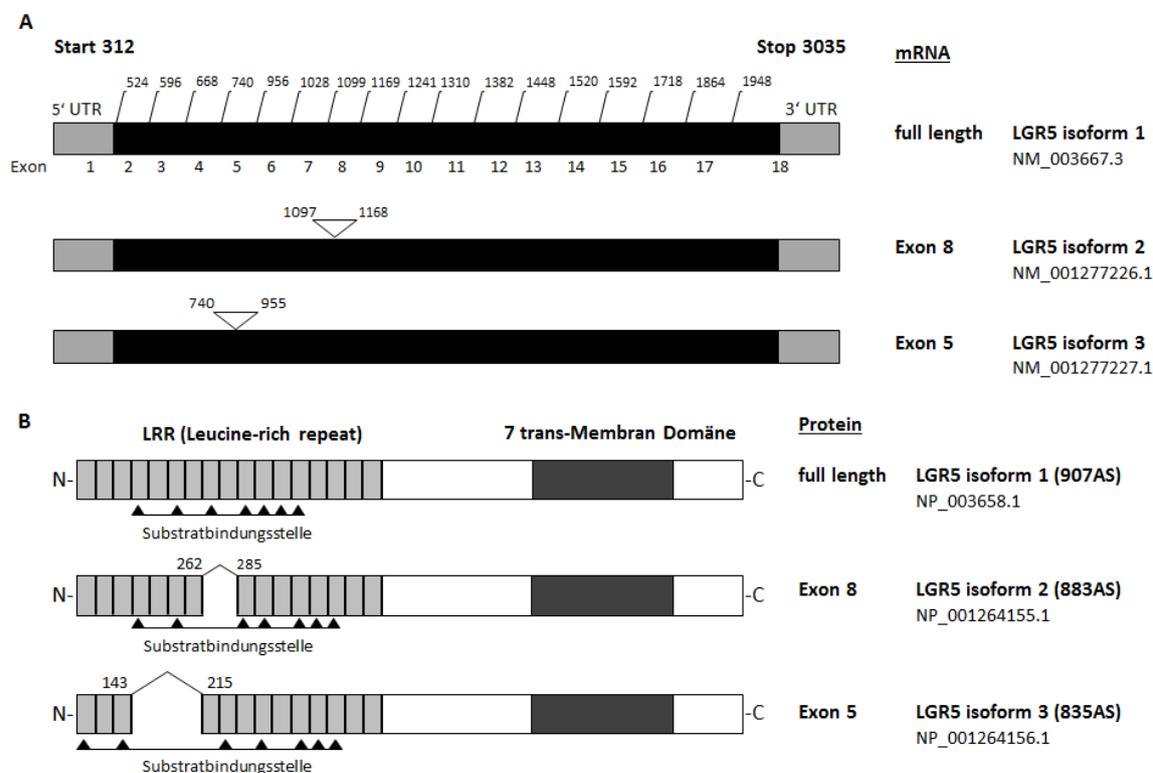
#### 4.2 Identifizierung der *LGR5* delta 5 Spleißvariante

Bei der Klonierung des *LGR5*FL wurde eine noch nicht beschriebene *LGR5*-Spleißvariante identifiziert. Diese Spleißvariante, bei der das Exon 5 durch alternatives Spleißen entfernt ist, wurde im Weiteren als *LGR5* $\Delta$ (delta)5 bezeichnet (Rot *et al.* 2011). Das Fehlen des Exon 5 hat den Verlust der Sequenz zwischen der Position bp740 und bp955 der *full length LGR5*-mRNA zur Folge. Dies entspricht in der Proteinsequenz der Aminosäuresequenz AS143-AS215 (Abb. 4.1). Für *LGR5* war zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit bereits eine Spleißvariante mit fehlendem Exon 8 in der NCBI-Datenbank hinterlegt. Hier resultiert das Spleißen im Verlust der Sequenz zwischen der Position bp1097 und bp1168 der *LGR5 full length*-mRNA, was der Aminosäuresequenz AS262 bis AS285 im Protein entspricht (Abb. 4.1). Zur Bedeutung dieser Variante sind in der Literatur bis dato keine Untersuchungen zu finden. In beiden Spleißvarianten resultiert das Spleißen in einer *in frame*-Verkürzung der N-terminalen Extrazellulärdomäne (ECD). Die Betrachtung des Domänenaufbaus der Extrazellulärdomäne zeigt, dass in der *LGR5* $\Delta$ 5 Variante die ECD ab der Mitte der LRR4-Domäne (*leucin-rich repeat*) bis zum Anfang der LRR7-Domäne verkürzt ist. Mittels Proteinkristallographie wurde die Interaktion zwischen *LGR5* und seinen Liganden, den R-Spondinen (RSPO), untersucht und die entscheidenden Interaktionsmodule beschrieben (Peng *et al.* 2013a; Chen *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013). Daher ist hier ein Vergleich zwischen der *LGR5 full length* und der *LGR5* $\Delta$ 5 Variante hinsichtlich der Ligandeninteraktionsmodule möglich.

Die Extrazellulärdomäne (ECD) des *LGR5* setzt sich aus 18 LRR-Domänen zusammen. Jede LRR-Domäne besteht aus 24 Aminosäuren. Im Detail besteht die *LGR5*-Extrazellulärdomäne (ECD) aus einem N-terminalen LRR (NLRR), welchem 17 LRRs und eine C-terminalen Gelenkregion folgen (Wang *et al.* 2013). Die 17 LRRs der *LGR5*-ECD bilden eine hufeisenähnliche Struktur aus, die zwischen der LRR11 und der LRR12 geknickt und um 20° gedreht ist (Peng *et al.* 2013a). Im Proteinkristall liegt der *LGR5*:RSPO1-Komplex als Homodimer (Komplex 2:2) vor (Peng *et al.* 2013a). In den R-Spondinen 1-4 und den LGRs 4-6 sind die am Interaktionsinterface beteiligten Aminosäuren konserviert, was dazu führt, dass die R-Spondine 1-4 die LGRs 4-6 binden können (Lau *et al.* 2011). Die proteinkristallographische Untersuchung des *LGR5*:RSPO1-Komplexes zeigt, dass die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand über die LRR3 bis LRR9 des *LGR5* und Fu1 (Aminosäuren 34-95) und Fu2 (Aminosäuren 97-143) des RSPO1 vermittelt wird. Folglich geht in der Variante *LGR5* $\Delta$ 5 durch das Herausspleißen des Exon 5 und der damit verbundenen Deletion der LRRs 4-7 (AS 143-214) die Ligandenbindestelle größtenteils verloren.

Im Detail wurden drei Interaktionsmodule (Kontaktstellen) zwischen *LGR5*FL und RSPO1 beschrieben (Peng *et al.* 2013a). An der ersten Kontaktstelle bilden die Phenylalanine Phe106 und Phe110 des RSPO1 eine Klammer um das Ala190 des *LGR5*FL. Das Ala190 des *LGR5*FL ist in einer Grube lokalisiert, die aus hydrophoben Aminosäureresten (His166-His216) gebildet wird. Die Mutationen A190D und

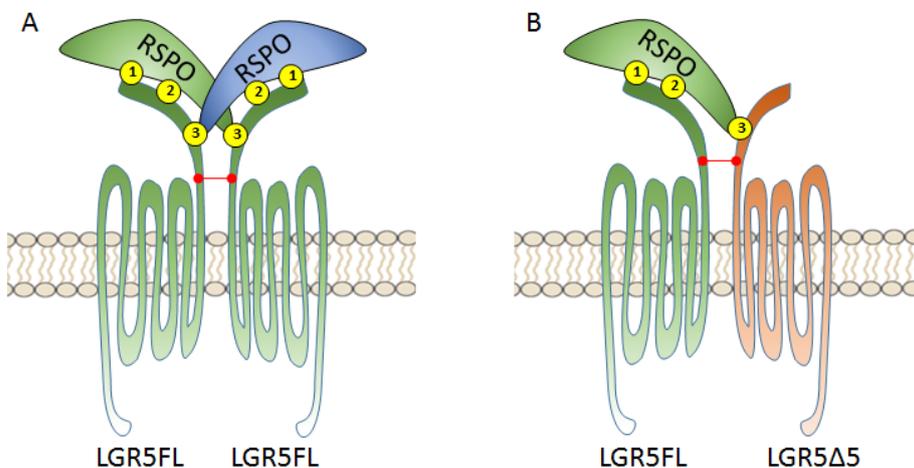
V214W im *LGR5*, welche die Struktur der hydrophoben Grube aufbrechen, resultieren in einer verringerten Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges (TOPFlash-Assay) (Peng *et al.* 2013a). In der *LGR5Δ5* Variante fehlt sowohl Ala190 als auch der Großteil der Aminosäurereste, welche zur Ausbildung der hydrophoben Grube um Ala190 beitragen.



**Abb. 4.1 LGR5 full length und die bekannten Spleißvarianten.** A. Dargestellt sind die *full length* LGR5-mRNA und alternativen Spleißvarianten. Die Zahlen unter der *full length* LGR5-mRNA bezeichnen die jeweiligen Exone, die Zahlen darüber beziehen sich auf das erste Nukleotid des Exons. Die Dreiecke markieren die herausgespleißte Stelle in der mRNA, die Zahlen neben den Dreiecken bezeichnen das erste und letzte Nukleotid, das durch Spleißen entfernt wird. UTR bezeichnet den nicht-translatierten Bereich der mRNA. B. Es sind die entsprechenden potenziellen Proteine dargestellt, wie sie im NCBI *conserved domains search tool* bezeichnet werden. Die Klammern markieren die herausgespleißte Stelle im Protein, die Zahlen neben den Klammern bezeichnen die erste und die letzte Aminosäure, welche durch das alternative Spleißen entfernt wurden. Die Substratbindungsstelle wurde durch einen Abgleich über NCBI *Conserved domains* vorhergesagt. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

An der zweiten Kontaktstelle interagieren die Aminosäurereste Asn123-Asn219 des LGR5FL mit den Aminosäureresten Lys59-Arg87 des RSPO1. Die Mutationen D146F und D170F im LGR5FL führen zum kompletten Verlust der TOPFlash-Aktivität und die Mutationen R144E und D171A im LGR5FL resultieren in einer verringerten TOPFlash-Aktivität (Peng *et al.* 2013a). Diese Kontaktstelle ist in der *LGR5Δ5* Variante mit Ausnahme der Aminosäuren His218 und Asn219 ebenfalls nicht vorhanden. Die dritte Kontaktstelle wird durch die Fu1-Domäne des RSPO1 und das letzte LRR sowie die  $\alpha$ -Helix am C-terminalen Gelenk der ECD des LGR5FL Homo-/Heterodimerpartner gebildet (Abb. 4.2). Diese Kontaktstelle ist in *LGR5Δ5* unverändert. Damit resultiert das Herausspleißen des Exon 5 im LGR5FL in einem nahezu kompletten Verlust von zwei der drei Ligandeninteraktionsmodule. Darüber hinaus hat ein Aminosäureaustausch an den Positionen 146 oder 170 des *full length LGR5* (diese fehlen der  $\Delta 5$

Variante) den kompletten Verlust der RSPO-vermittelten TOPFlash-Aktivität zur Folge, welche nach Überexpression des LGR5FL zu beobachten war (Peng *et al.* 2013a). So erscheint eine R-Spondin-abhängige Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalweges über die  $\Delta 5$  Variante als unwahrscheinlich.



**Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen RSPO1 und LGR5FL (A) bzw. LGR5Δ5 (B).** LGR5FL bildet Homodimere aus und ist befähigt auch Heterodimere mit der Spleißvariante  $\Delta 5$  auszubilden, schematisch dargestellt als rote Linie. (A) RSPO interagiert mit LGR5FL an drei Kontaktstellen (1, 2, 3), wobei an der Kontaktstelle 3 das RSPO mit dem LGR5FL Homodimerpartner interagiert. (B) In der LGR5 Spleißvariante  $\Delta 5$  sind die Kontaktstellen 1 und 2 herausgespleißt. Eine Interaktion mit RSPO an der Kontaktstelle 3 ist bei Heterodimerisierung mit LGR5FL möglich.

Im Proteinkristall liegt LGR5FL als Homodimer vor (Peng *et al.* 2013a), an der Zelloberfläche der HEK293T-Zellen wurden zudem LGR5:LGR4-Heterodimere nachgewiesen (Lau *et al.* 2011). Die Ausbildung von LGR5FL-Homodimeren wird über die Aminosäurereste Tyr289, Asp290, Tyr361, His383, Trp407, Leu433 und His454 vermittelt (Peng *et al.* 2013a). Das Dimerisierungsinterface ist in LGR5Δ5 unverändert. Daher kann angenommen werden, dass LGR5Δ5 sowohl mit LGR5FL als auch seinen Homologen LGR4 bzw. LGR6 Heterodimere ausbilden kann. In diesen Heterodimeren könnte LGR5Δ5 mit der Fu1-Domäne des R-Spondins, welches an den Dimerpartner gebunden ist, interagieren. Es ist nicht bekannt, welche Bedeutung die Homo- und Heterodimerisierung für die Funktion des LGR5FL als Verstärker des kanonischen Wnt-Signalweges hat. Zwar wurde von Peng und Kollegen gezeigt, dass der Aminosäureaustausch im Dimerisierungsinterface von LGR5 an den Positionen 289, 290 und 454 keinen Einfluss auf die TOPFlash-Aktivität hat (Peng *et al.* 2013a), in dieser Studie wurde jedoch nicht untersucht, inwiefern dieser Aminosäureaustausch tatsächlich die Dimerisierung blockiert. Zur Funktion der LGR5Δ5 und LGR5Δ8 Varianten ist aus der Literatur nichts bekannt. Es ist denkbar, dass LGR5Δ5 sowohl als Homo- und Heterodimerpartner in den kanonischen Wnt-Signalweg involviert ist als auch an anderen Signaltransduktionswegen beteiligt ist. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass LGR5FL den  $G_{12/13}$ -Rho-GTPase-Signalweg aktivierte, wobei diese Aktivierung unabhängig von R-Spondinen erfolgte (Kwon *et al.* 2013).

### 4.3 Modulation der *LGR5*-Expression in Tumorzelllinien

Um die molekular- und zellbiologischen Auswirkungen einer veränderten *LGR5*-Expression zu untersuchen, wurde der *LGR5*-mRNA-Gehalt der Zellen stabil durch shRNA reduziert oder mittels *LGR5FL* und *LGR5Δ5* Expressionsplasmiden erhöht. Zur Reduktion der *LGR5*-Expression wurden zwei verschiedene shRNAs (shRNA1 und shRNA2), welche sowohl gegen *LGR5 full length* als auch gegen die bekannten Spleißvarianten ( $\Delta 5$  und  $\Delta 8$ ) gerichtet sind, eingesetzt. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurde dabei eine Reduktion des *LGR5*(Gesamt)-mRNA-Gehalts von 50 % (HT29) bis 80 % (MCF7) erreicht. In Western Blot-Analysen ist eine Reduktion des *LGR5*-Proteingehaltes nach Transduktion der shRNAs für die Zelllinien HT29 und RD nachweisbar. In den Zelllinien HaCaT, MCF-7 und SKLMS-1 ist bereits in den Kontrollen kein endogenes *LGR5*-Protein detektierbar. Die Überexpression von *LGR5 full length* und *LGR5Δ5* erfolgte mithilfe von Expressionsplasmiden unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide resultiert in einem 10fach (HT29) bis 200fach (MCF-7) erhöhten *LGR5*(Gesamt)-mRNA-Gehalt. Zudem ist in den Zelllinien HaCaT, SKLMS-1 und MCF-7 eine deutliche Steigerung des *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*- Proteingehaltes detektierbar. In der Kolonkarzinomzelllinien HT29 ist nach lentiviraler Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide trotz 10fach erhöhtem *LGR5*(Gesamt)-mRNA-Gehalt nur eine schwache Zunahme des *LGR5FL*-Proteingehalts nachweisbar. Das *LGR5*-Protein in den Zelllinien SKBR3 und SF767 konnte in den Western Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Instabilität des hier verwendeten, experimentellen Antikörpers zurückgeführt werden, da die experimentelle Versuchsdurchführung in den Zelllinien SKBR3 und SF767 im Anschluss an die anderen Zelllinien erfolgte.

Ein erfolgreicher *LGR5 knockdown* wurde für Kolonkarzinom- (Walker *et al.* 2011), Glioblastom- (Nakata *et al.* 2013), Mammakarzinom- (Oskarsson *et al.* 2011), Cervixkarzinom- und Sarkomzelllinien (Scannell *et al.* 2013) sowie für Fibroblasten und die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (Tanese *et al.* 2008) gezeigt. Dabei variierte die Effektivität des *LGR5 knockdown*, wie auch in dieser Arbeit in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Zelllinie zwischen 50% und 90 % auf mRNA-Niveau. Weiterhin wurde das *LGR5FL* in Kolonkarzinom-(Walker *et al.* 2011) und Zervixkarzinomzelllinien (Chen *et al.* 2014a) sowie in HaCaT-Zellen (Tanese *et al.* 2008) überexprimiert. Dabei wurde der *LGR5FL*-mRNA-Gehalt, zelllinienabhängig, um das 2 bis 40fache erhöht. Das *LGR5*-Protein kann im Western Blot aufgrund fehlender geeigneter Antikörper erst seit Kurzem erfolgreich nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2014a). Die *LGR5Δ5* Variante wurde bis dato nicht untersucht.

### 4.4 Einfluss einer veränderten *LGR5*-Expression auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges

Die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges wurde in den Zelllinien MCF-7, SF767, HaCaT, HT29, SKBR3, SKLMS-1, RD und HEK293T mittels TOPFlash-Assay bestimmt. Der Mechanismus der *LGR5*-RSPO-vermittelten Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalweges beruht auf der Interaktion des

LGR5:RSPO Komplexes mit den negativen Regulatoren des Wnt-Signalweges RNF43 bzw. ZNRF3 (Kap. 1.5.3). Es wurde gezeigt, dass die RSPO1-abhängige Potenzierung des kanonischen Wnt-Signalweges in HEK293T-Zellen auf der endogenen Expression von *WNT3A* beruht. Die Reduktion der *WNT3A*-Expression durch siRNA blockierte die RSPO1-vermittelte Verstärkung des TOPFlash-Signals in HEK293T-Zellen (Binnerts *et al.* 2007). Um die Effekte der Agonisten-Behandlung (*WNT3A* und RSPO1) auf die TOPFlash-Aktivität in den untersuchten Zelllinien (MCF-7, SF767, HaCaT, HT29, SKBR3, SKLMS-1, RD und HEK293T) zu beurteilen, wurden daher die endogenen Expressionslevel von *LGR4* und *LGR6*, *RSPO1-4* sowie *WNT3A* und der LGR5-Interaktionspartner *ZNRF3* und *RNF43* bestimmt (Tabelle 7.20). In dieser Arbeit war für die Weichteilsarkomzelllinie SKLMS-1 im TOPFlash-Assay eine Agonisten-abhängige (*WNT3A*, RSPO1) Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges nicht nachweisbar (Kap. 3.2; Abb. 3.2). Diese Zelllinie weist einen niedrigen endogenen mRNA-Level von *LGR5*, *LGR4* und *WNT3A* und einen hohen mRNA-Level des negativen Regulators der kanonischen Wnt-Signalkaskade *ZNRF3* auf (Tabelle 7.20). *RSPO1-4*- sowie *LGR6*-mRNA konnte nicht detektiert werden. Die fehlende Aktivierbarkeit des TOPFlash-Reporters in den SKLMS-1-Zellen könnte auf die hohe endogene *ZNRF3*-Expression und im Gegenzug die niedrige endogene *LGR5*- und *LGR4*-Expression zurückzuführen sein. Die FZD-Rezeptoren würden in diesem Fall effektiv von der Oberfläche entfernt werden und die Zellen so gegen das Wnt-Signal desensibilisiert werden.

Die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte Weichteilsarkomzelllinie RD weist im Vergleich zur SKLMS-1 ähnliche mRNA-Level für *WNT3A*, *RSPO1/3/4*, *LGR4/6*, *ZNRF3* und *RNF43* auf. Der *LGR5*-mRNA-Gehalt der RD-Zellen ist jedoch um ein Vielfaches höher als in der Zelllinie SKLMS-1 und es ist zudem *RSPO2*-mRNA-detectierbar (Tabelle 7.20). In RD-Zellen erfolgt, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, eine deutliche Steigerung des TOPFlash-Signals sowohl durch die alleinige Behandlung mit *WNT3A* als auch durch die simultane Behandlung mit *WNT3A* und RSPO1 (Abb. 3.2). Dies könnte auf die hohe endogene *LGR5*-Expression sowie auf das Vorhandensein vom endogenen RSPO2 zurückzuführen sein. Der negative Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges *ZNRF3* könnte in diesem Fall von der Zelloberfläche effektiv entfernt werden. Wodurch eine Verstärkung des Wnt-Signals sowohl durch exogenes *WNT3A* alleine als auch durch die simultane Stimulierung mit *WNT3A* und RSPO1 ermöglicht wäre. Die Stimulierung der RD-Zellen mit RSPO1 alleine hat eine vergleichsweise schwache (und nicht signifikante) Aktivierung des TOPFlash Reporters zur Folge — verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen, was mit einer niedrigen endogenen *WNT3A*-Expression korreliert (Tabelle 7.20).

Die Zelllinien HT29 weist einen den RD Zellen vergleichbaren *WNT3A*-mRNA-Gehalt auf, eine alleinige Stimulierung der HT29-Zellen mit RSPO1 induziert jedoch ein starkes TOPFlash-Signal. In den Zelllinien HT29 und SKBR3 ist, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, eine deutliche Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach alleiniger Stimulierung mit RSPO1 oder simultaner Stimulierung mit *WNT3A* und RSPO1 zu beobachten. Eine alleinige Zugabe vom exogenen *WNT3A* hat keine Auswirkungen auf die Aktivität des TOPFlash-Reporters in diesen Zelllinien. In den beiden Zelllinien HT29 und SKBR3 sind hohe endogene mRNA-Level von *LGR4*, *LGR5*, *RNF43* und *ZNRF3* sowie ein niedriger endogener *WNT3A*-mRNA-Level nachweisbar (Tabelle 7.20). Zudem exprimieren die SKBR3-Zellen *LGR6* und

*RSPO4*. Dieses Expressionsprofil spiegelt sich im TOPFlash wider. Die Zugabe von WNT3A alleine reicht in den HT29- und SKBR3-Zellen nicht aus, um ein TOPFlash-Signal deutlich zu erhöhen. Dies könnte auf die fehlende bzw. niedrige (SKBR3) endogene Expression der *RSPOs* zurückzuführen sein. Die FZD-Rezeptoren würden in Abwesenheit vom exogenen *RSPO1* durch RNF43/ZNRF3 effektiv von der Zelloberfläche entfernt, was die Stimulierbarkeit des TOPFlash-Reporters durch exogenes WNT3A herabsetzt. Das in der SKBR3 endogen exprimierte *RSPO4* scheint sich in diesem Kontext nicht auszuwirken: eventuell aufgrund seines niedrigen Expressionslevels. Dagegen steigert eine alleinige Zugabe von *RSPO1* oder die simultane Stimulation mit *RSPO1* und WNT3A in den Zelllinien HT29 und SKBR3 die TOPFlash-Aktivität deutlich. Dieser Effekt könnte auf die hohe endogene *LGR4/5*-Expression zurückzuführen sein. Durch exogenes *RSPO1* würde das RNF43/ZNRF3 *LGR4/5*-abhängig von der Zelloberfläche entfernt werden, sodass die Menge der FZD-Rezeptoren in der Zellmembran ansteigt und die Zellen sensitiver auf endogenes sowie exogenes WNT3A reagieren.

In den Zelllinien MCF-7, SF767 und HaCaT ist, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, eine Steigerung der Aktivität des TOPFlash-Reporters nur durch simultane Behandlung mit WNT3A und *RSPO1* zu beobachten (Abb. 3.2). Diese drei Zelllinien exprimieren endogen wenig *LGR4/LGR5* und weisen vergleichbare Expressionslevels von *ZNRF3* sowie eine geringe endogene Expression von *WNT3A* auf (Tabelle 7.20). In der Zelllinie SF767 ist zudem *LGR6*-mRNA nachweisbar. Die Zelllinie MCF-7 fällt dadurch auf, dass diese einen vergleichsweise hohen *WNT3A*-mRNA-Gehalt aufweist und als einzige unter den Tumorzelllinien *RSPO1* endogen exprimiert (Tabelle 7.20). Allgemein ist in diesen drei Zelllinien (MCF-7, HaCaT und SF767) die alleinige Zugabe von WNT3A oder *RSPO1* nicht ausreichend, um das TOPFlash-Signal deutlich zu steigern. Dies könnte in den Zelllinien SF767 und HaCaT auf die niedrige endogene *LGR4/5*-Expression sowie das Fehlen von endogenen *RSPOs* zurückzuführen sein. In Abwesenheit von exogenem *RSPO1* würden die FZD-Rezeptoren durch *ZNRF3* effektiv von der Oberfläche entfernt werden, was die Ansprechbarkeit für exogenes WNT3A herabsetzen würde. Das in den MCF-7-Zellen endogen exprimierte *RSPO1* ist – möglicherweise aufgrund der niedrigen *LGR4/5/6*-Expression – nicht ausreichend, um in Folge der WNT3A-Stimulation ein verstärktes TOPFlash-Signal zu vermitteln. In Anwesenheit vom exogenen *RSPO1* ist das endogen exprimierte *WNT3A* offenbar in allen drei Zelllinien (MCF-7, SF767, HaCaT) nicht ausreichend, um die Aktivität des TOPFlash-Reporters zu steigern. Erst in Anwesenheit hoher Konzentrationen von WNT3A und *RSPO1* ist die Aktivität des TOPFlash-Reporters – verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen – deutlich erhöht.

Die Zelllinie HEK293T weist einen hohen mRNA-Level von *LGR4/5/6*, *WNT3A*, *RSPO1-3* und *RNF43/ZNRF3* auf. Entsprechend ist in den HEK293T-Zellen sowohl nach einer alleinigen als auch nach einer simultanen Stimulation mit WNT3A und *RSPO1* die TOPFlash-Aktivität, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, erhöht.

Zusammenfassend zeigt sich, dass nicht nur die Anwesenheit der in die *LGR5*-Kaskade eingebundenen Proteine, sondern auch deren Zusammenspiel und weitere bis dato nicht identifizierte zelluläre

Faktoren für die Vermittlung und Potenzierung des kanonischen Wnt-Signals entscheidend sein können.

Nach der Etablierung der Zellkulturen mit einer stabil reduzierten *LGR5*-Expression bzw. stabil erhöhten *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expression wurde mittels TOPFlash-Assay untersucht, wie sich diese Expressionsveränderungen auf die Aktivität bzw. Aktivierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalweges nach Zugabe von Agonisten (WNT3A und RSPO1) auswirkt. Diese Untersuchungen wurden an den Zelllinien SKBR3, RD, HT29 und MCF-7 durchgeführt. Die Transduktion der shRNA sowie der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide hat in dieser Arbeit keine deutlichen Auswirkungen auf die TOPFlash-Aktivität. Lediglich in der Zelllinie HT29 kann nach der Transduktion der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide eine leichte Steigerung der TOPFlash-Aktivität unter Stimulierung mit RSPO1 im Vergleich zu der Kontrolle LVKtr beobachtet werden (Abb. 3.9; Tabelle 7.7; Kap. 3.7). Inwiefern sich jedoch die Steigerung der TOPFlash-Aktivität unter RSPO1-Stimulierung auf die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide zurückzuführen ist, bleibt fraglich. Denn es ist in dieser Versuchsreihe nur eine schwache Steigerung der TOPFlash-Aktivität in der Leervektorkontrolle (LVKtr) durch die alleinige Stimulation mit RSPO1 (*fold change* (Stimulierung)=2,06;  $p=0,13$ ) zu beobachten — verglichen zu den initialen Untersuchungen (*fold change* (Stimulierung)=16,32;  $p=0,002$ ) (Kap. 3.2) oder auch der, in der Versuchsreihe mitgeführten shRNA-Kontrolle (shKtr) (*fold change* (Stimulierung)=5,18;  $p=0,06$ ). Für die Zelllinie HT29 ist eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges infolge einer Mutation im *APC*-Gen beschrieben (Ilyas *et al.* 1997). In dieser Arbeit konnte in nicht-stimulierten HT29-Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen dem TOPFlash- und FOPFlash-Signal (*ratio*) nur in den Behandlungen shKtr und shRNA1 beobachtet werden (Tabelle 7.7). Eine mögliche Erklärung wäre die schlechte Transfizierbarkeit der HT29-Zellen, wodurch die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges in der Zelllinie HT29 durch den TOPFlash-Assay nicht sensitiv genug wiedergegeben wird.

In der Literatur finden sich uneinheitliche Berichte über die Effekte einer Inhibierung der *LGR5*-Expression auf die TOPFlash-Aktivität. Ein *LGR5 knockdown* in den Cervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa reduzierte unter normalen Kultivierungsbedingungen (10 % FKS) ohne zusätzliche Zugabe exogener Agonisten das TOPFlash-Signal (Chen *et al.* 2014a). Im Gegensatz dazu hatte eine Reduktion der *LGR5*-Expression in Ewingsarkomzelllinien unter normalen Kultivierungsbedingungen (10 % FKS) keinen Einfluss auf die TOPFlash-Aktivität. Eine durch die Agonisten (WNT3A; RSPO2) vermittelte Verstärkung des TOPFlash-Signals wurde in diesen Zellen jedoch durch ein *LGR5 knockdown* inhibiert (Scannell *et al.* 2013). In HEK293T-Zellen hatte die Reduktion der *LGR5*-Expression durch siRNA keine Auswirkungen auf die R-Spondin-vermittelte Aktivität des TOPFlash-Reporters. Wohingegen die Reduktion der *LGR4*-Expression die R-Spondin-vermittelte TOPFlash-Aktivierung blockierte. Eine nachfolgende Steigerung der *LGR5*-Expression mittels eines Expressionsplasmids hob diese Blockierung wieder auf (*rescue* des Signals). Die Autoren vermuteten daher, dass *LGR4* eine dominante Rolle bei der Verstärkung des kanonischen Wnt-Signals übernimmt (Ruffner *et al.* 2012). In dieser Arbeit weisen die Zelllinien HT29, RD und SKBR3 mehr *LGR5*- als *LGR4*-mRNA auf (Tabelle 7.20).

Wohingegen der LGR4-mRNA-Gehalt der Zelllinie MCF-7 höher ist als der LGR5-mRNA-Gehalt (Tabelle 7.20). Somit ist es denkbar, dass zumindest in MCF-7-Zellen die Auswirkungen einer Reduktion der LGR5-Expression auf die TOPFlash-Aktivität durch die LGR4-vermittelte Verstärkung des Wnt-Signals kompensiert werden.

Der Einfluss einer *LGR5FL*-Überexpression auf die Aktivität des TOPFlash Reporters wurde in den Cervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa (Chen *et al.* 2014a) und in den HEK293T Zellen (Ruffner *et al.* 2012) untersucht. Hier resultierte eine *LGR5FL*-Überexpression einheitlich in einer Verstärkung des TOPFlash-Signals. Im Gegensatz dazu hat in dieser Arbeit sowohl die Überexpression von *LGR5FL* als auch von *LGR5Δ5* in den Zelllinien MCF-7 und HT29 keinen deutlichen Einfluss auf die TOPFlash-Aktivität (Abb. 3.8; Abb. 3.9). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die eingesetzte Konzentration der Agonisten WNT3A und RSPO1 darstellen. In dieser Arbeit wurde in Vorversuchen an den Zelllinien MCF-7 und HT29 die optimale Konzentration für RSPO1 und WNT3A als die Konzentration festgelegt, bei der eine deutliche Steigerung des TOPFlash-Signals im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle erfolgt – hier jeweils 150 ng/ml. In der Literatur variieren die WNT3A- bzw. RSPO1-Konzentrationen, welche für die Stimulierung der Zelllinie HEK293T im TOPFlash eingesetzt wurden, je nach Veröffentlichung deutlich. So wird beispielsweise RSPO1 in einem Konzentrationsbereich zwischen 25 ng/ml (Kwon *et al.* 2013) und 300 ng/ml (Deng *et al.* 2013) eingesetzt. In den HEK293T-Zellen wurde gezeigt, dass die TOPFlash-Aktivität in Abhängigkeit von der RSPO1-Konzentration (bei gleichbleibender WNT3A Konzentration) einen sigmoiden Kurvenverlauf aufweist (Carmon *et al.* 2011). Eine verstärkte Expression von *LGR5FL* sensibilisiert die HEK293T-Zellen gegenüber RSPO1, d. h. die TOPFlash-Maximumaktivität wird bei einer niedrigeren RSPO1-Konzentration erreicht. Die Höhe der TOPFlash-Maximumaktivität bleibt nach *LGR5FL*-Überexpression jedoch unverändert. In den Zelllinien MCF-7 und HT29 wäre es denkbar, dass die Steigerung der TOPFlash-Aktivität nach Stimulierung im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle das TOPFlash-Maximum widerspiegelt. Dann wäre bei einer RSPO1-Konzentration von 150 ng/ml bereits ohne *LGR5FL*-Überexpression das obere Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht. Damit wäre in diesem Ligandenkonzentrationsbereich durch die *LGR5FL*-Überexpression keine weitere Steigerung des TOPFlash-Signals möglich. Möglicherweise könnte in den Zelllinien MCF-7, HT29, RD und SKBR3 durch die Erstellung von RSPO1-Dosis-Wirkungskurven eine eindeutige Aussage über die Auswirkungen einer Reduktion der *LGR5*-Expression sowie einer gesteigerten Expression von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges getroffen werden.

#### 4.5 Auswirkungen einer veränderten *LGR5*-Expression auf das zellbiologische Verhalten von Tumorzelllinien

Effekte der Transduktion der shRNA- und *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide auf das zellbiologische Verhalten der Tumorzelllinien sind heterogen und jeweils von der untersuchten Zelllinie abhängig. Besonders bemerkenswert ist, dass die Überexpression der Spleißvariante  $\Delta 5$  exakt die gleichen zellbiologischen Effekte auf das klonogene Zellüberleben, die Migration und die

Sphäroidbildung hat wie die Überexpression der *full length LGR5*-Variante. Generell hat eine Reduktion der *LGR5*-Expression deutlich stärkere Auswirkungen auf die untersuchten zellbiologischen Messgrößen als eine Überexpression des *LGR5FL* oder *LGR5Δ5*. So wird in den Zelllinien HaCaT, RD und SKLMS-1 nach der Reduktion der *LGR5*-Expression eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, in der Zelllinie HT29 eine verringerte und in den HaCaT-Zellen eine gesteigerte Migrationsrate beobachtet. Eine Überexpression von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* führt lediglich in der Zelllinie HaCaT zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens und einer gesteigerten Migrationsrate sowie in der Zelllinie HT29 zu einer Zunahme der Migrationsrate.

Untersuchungen an Kolorektalkarzinom-, Basalzellkarzinom-, Magentumor-, Glioblastom- und Cervixkarzinomzelllinien zeigen, dass eine hohe *LGR5*-Expression in diesen Zellen mit einer erhöhten Zellproliferation, Migration und Invasion sowie herabgesetzter Apoptose assoziiert war. Die Reduktion der *LGR5*-Expression reduzierte dementsprechend die Proliferation, Klonogenität *in vitro* und Tumorigenität *in vivo* und induzierte darüber hinaus Apoptose und Zellzyklusarrest. (Hirsch *et al.* 2014; McClanahan *et al.* 2006; Tanese *et al.* 2008; Kemper *et al.* 2012; Al-Kharusi, Manal R A *et al.* 2013; Nakata *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014a; Chen *et al.* 2014b; Wang *et al.* 2014; Wang and Liu 2015). Diese Befunde identifizieren *LGR5* somit als einen Promotor der Tumorprogression. In dieser Arbeit führt die Reduktion der *LGR5*-Expression in den WTS-Zelllinien RD und SKLMS-1 zur Reduktion des klonogenen Zellüberlebens (Abb. 3.12). Dagegen wurde die Proliferation von Ewingsarkomzelllinien (mesenchymaler Ursprung) durch die Modulation der *LGR5*-Expression nicht beeinflusst (Scannell *et al.* 2013). In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 konnte in dieser Arbeit eine Reduktion der Migrationsrate nach Reduktion der *LGR5*-Expression und eine Steigerung der Migrationsrate nach Überexpression von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* gezeigt werden (Abb. 3.16; Abb. 3.17). Im Einklang hierzu beobachteten Chen und Kollegen eine Inhibierung der Invasionsrate der HT29-Zellen nach *LGR5 knockdown* (Chen *et al.* 2014b). Hirsch und Kollegen fanden dagegen keine Auswirkungen einer Reduktion der *LGR5*-Expression auf die Migrationsrate von HT29-Zellen (Hirsch *et al.* 2014). Eine *in vivo* Studie zeigte, dass eine Reduktion der *LGR5*-Expression die Metastasierungseffizienz von Mammakarzinomzelllinien in der Lunge von Mäusen reduziert (Oskarsson *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit hat eine Modulation der *LGR5*-Expression in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und SKBR3 jedoch keine Auswirkungen auf die Klonogenität im Koloniebildungstest oder Migrationsrate (Abb. 3.12; Abb. 3.13; Abb. 3.16; Abb. 3.17). Demgegenüber steht eine Studie zu Kolonkarzinomzelllinien, in welcher ein *LGR5 knockdown* eine erhöhte und eine *LGR5FL*-Überexpression eine verringerte Koloniebildungsrate im *soft agar assay* sowie eine verringerte Tumorigenität im Mausmodell zur Folge hatte (Walker *et al.* 2011). Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass Kolonkarzinomzellen nach Reduktion der *LGR5*-Expression schneller und nach *LGR5FL* Überexpression langsamer im *transwell motility assay* migrierten. So scheint in diesem zellulären Kontext *LGR5* als Tumorsuppressor zu agieren (Walker *et al.* 2011).

Nach der Identifizierung des *LGR5* als Stammzellmarker in verschiedenen Geweben wurde seine Bedeutung als Tumorstammzellmarker diskutiert (Barker und Clevers 2010). Die *in vitro* Sphäroidkultur

wird als eine Möglichkeit beschrieben, Tumorstammzellen anzureichern (Kemper *et al.* 2012). Für Sphäroide von Kolorektal- und Mammakarzinomen wurde eine erhöhte *LGR5*-Expression im Vergleich zur adhärenenten Kultur gezeigt (Kemper *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013b; Hirsch *et al.* 2014; Hiraoka *et al.* 2015; Wang *et al.* 2014; Yang *et al.* 2015). Dabei wiesen die Sphäroid-Zellen *in vivo* in Mäusen ein höheres tumorigenes Potential und *in vitro* ein höheres Koloniebildungspotenzial auf als Zellen, welche adhärenent kultiviert wurden (Hirsch *et al.* 2014; Kemper *et al.* 2012; Yang *et al.* 2015).

Mit Ausnahme der Glioblastomzelllinien SF767 weisen alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien die Fähigkeit auf, Sphäroide auszubilden. Die Reduktion der *LGR5*-Expression in den Weichteilsarkomzelllinien SKLMS-1 und RD führt zur Auflockerung der inneren Sphäroidarchitektur (Abb. 3.18; Abb. 7.1). Darüber hinaus wird in der Zelllinie SKLMS-1 nach Reduktion der *LGR5*-Expression die Formation größerer Sphäroide beobachtet. Die Transduktion der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* Expressionsplasmide hat in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Sphäroidgröße (Abb. 3.20). Die Reduktion der *LGR5*-Expression in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 beeinflusst die Sphäroidbildungsfähigkeit dieser Zellen nicht (Abb. 7.2). In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bewirkt die Reduktion der *LGR5*-Expression die Bildung größerer Sphäroide sowie die Auflockerung der inneren Sphäroidarchitektur (Abb. 3.20; Abb. 3.19). Die Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide in dieser Zelllinie hat die Formation von mehreren Hohlräumen im Sphäroid zur Folge (Abb. 3.19). In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 beeinflusst die Modulation der *LGR5*-Expression die Sphäroidbildung nicht (Abb. 7.3). Dagegen wurde in anderen Studien in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach Reduktion der *LGR5*-Expression eine Verringerung der Sphäroidgröße und der Sphäroidbildungsfähigkeit beobachtet (Hirsch *et al.* 2014; Liu *et al.* 2013b), während eine *LGR5FL*-Überexpression in dieser Zelllinie zur Ausbildung größerer Sphäroide führte und die Sphäroidbildungsfähigkeit dieser Zellen verbesserte (Liu *et al.* 2013b). In weiteren Kolonkarzinomzelllinien wurde ein Auflösen der Sphäroidstruktur nach Reduktion der *LGR5*-Expression und die Ausbildung kompakterer Sphäroide nach Überexpression von *LGR5FL* beobachtet (Walker *et al.* 2011). Ähnliches wurde auch in dieser Arbeit in den Zelllinien SKLMS-1, RD und MCF-7 beobachtet. Hier führt die Reduktion der *LGR5*-Expression zur Auflockerung der inneren Sphäroidarchitektur (Abb. 7.1; Abb. 3.18; Abb. 3.19). Während die Glioblastomzelllinie SF767 in dieser Arbeit keine Sphäroide ausbildet, wurden für die Glioblastomzelllinien U87 und GB2 eine reduzierte Sphäroidbildungsfähigkeit nach *LGR5 knockdown* beobachtet (Wang *et al.* 2014; Hiraoka *et al.* 2015; Hirsch *et al.* 2014). Eine Arbeit an Mammakarzinomen zeigte, dass Zellen mit einer hohen *LGR5*-Expression (*LGR5<sup>high</sup>*) eine bessere Sphäroidbildungsfähigkeit als Zellen mit niedriger *LGR5*-Expression aufwiesen (Yang *et al.* 2015). In dieser Arbeit führt die Transduktion der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zur Ausbildung von Hohlräumen innerhalb des Sphäroids. In der Literatur sind solche Auswirkungen einer *LGR5*-Überexpression auf die Sphäroidbildung nicht beschrieben. Darüber hinaus sind in der Literatur Berichte über das Auftreten solcher Hohlräume in Sphäroiden nicht zu finden. Über die Mechanismen, welche die Ausbildung der beobachteten Hohlräume in den MCF-7 Sphäroiden vermitteln, kann daher nur spekuliert werden. Einerseits könnten

an der Entstehung solcher Hohlräume im Sphäroid physiologische Prozesse beteiligt sein, bei denen die Ausbildung der Hohlräume z. B. über gesteuerte Migrations- und Differenzierungsvorgänge vermittelt wird. Unter den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien exprimiert die Zelllinie MCF-7 als einzige endogen sowohl WNT3A als auch RSPO1 (Tabelle 7.20). Dies hat möglicherweise eine robuste Autostimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges innerhalb des Sphäroids zur Folge. Sodass durch die Überexpression von *LGR5FL* die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges massiv erhöht wird. Die Überexpression der *LGR5*-Spleißvariante  $\Delta 5$ , welcher die RSPO-Erkennungsstelle fehlt, führt ähnlich wie die Überexpression der *LGR5 full length* Variante zur Ausbildung von Hohlräumen in den MCF-7 Sphäroiden. Inwiefern die *LGR5* Spleißvariante  $\Delta 5$  z. B. über Dimerisierung mit *LGR5FL* Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg nehmen kann, ist nicht bekannt. Andererseits könnten bei der Entstehung der Hohlräume in den MCF-7 Sphäroiden auch mechanische Prozesse wie Aufreißen der Innenstruktur des Sphäroids eine Rolle spielen. So könnte die Entstehung der Hohlräume einen sekundären Effekt des Einflusses einer *LGR5FL*- bzw. *LGR5 $\Delta 5$* - Überexpression auf verschiedene zellbiologische Vorgänge z. B. Expression von Adhärenzproteinen darstellen.

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT, als Normalzelllinie, fällt in dieser Arbeit auf, da sowohl die Reduktion der *LGR5*-Expression als auch die Überexpression von *LGR5FL* oder *LGR5 $\Delta 5$*  in den HaCaT-Zellen gleichgerichtete Effekte zur Folge hat. So ist sowohl nach der Reduktion der *LGR5*-Expression als auch nach Erhöhung der *LGR5FL*-Expression eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, eine erhöhte Migrationsrate sowie die Ausbildung von kleineren Sphäroiden in der 3D-Kultur zu beobachten (Abb. 3.12; Abb. 3.13; Abb. 3.16; Abb. 3.17; Abb. 3.20). Die Überexpression von *LGR5 $\Delta 5$*  hat keinen Einfluss auf die Sphäroidgröße und das klonogene Zellüberleben, erhöht jedoch die Migrationsrate tendenziell ( $p=0,09$ ). Paradoxerweise ist nach Reduktion der *LGR5*-Expression bzw. nach Überexpression von *LGR5FL* und *LGR5 $\Delta 5$*  eine diametrale Regulation der Genexpressionsmuster von EMT-Markern (z. B. *SNAIL2*) und Wnt-Zielgenen (z. B. *DKK1*) zu beobachten. Lediglich *TWIST1* wird in dieser Zelllinie unabhängig von der Art der *LGR5*-Modulation jeweils verstärkt exprimiert. Tanese und Kollegen beschrieben eine erhöhte Proliferationsrate in den HaCaT-Zellen nach *LGR5*-Überexpression. Darüber hinaus erlangten diese *LGR5*-überexprimierenden HaCaT-Zellen die Fähigkeit, in immundefizienten Mäusen Tumoren auszubilden (Tanese *et al.* 2008).

Die Effekte der Modulation der *LGR5*-Expression auf zellbiologische Parameter in dieser Arbeit sind zelllinienabhängig. Eine kontextabhängige Funktionsweise des *LGR5* wird in der Literatur diskutiert. Untersuchungen an Mäusen zeigen eine stark ausgedehnte *LGR5*-Expression während der Embryogenese, wobei sich postnatal die *LGR5*-Expression auf einzelne Stammzellpopulationen wie Stammzellen der Haarfollikel oder des Magen-Darmtraktes beschränkte (Barker und Clevers 2007, 2010). In normalen adulten Stammzellen trägt *LGR5* zur Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotenzials und der Proliferation der Stammzellen bei (Barker und Clevers 2010). In dieser Arbeit ist auffällig, dass in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3, welche einen hohen *LGR5*-mRNA-Gehalt aufweist, die Reduktion der *LGR5*-Expression keine zellbiologischen Effekte verursacht. Demgegenüber zeigten sich in den Zelllinien SKLMS-1 und HaCaT mit einem niedrigen

LGR5-mRNA-Gehalt messbare zellbiologische Effekte. Diese widersprüchlichen Beobachtungen zeigen, dass LGR5 je nach Zelllinie unterschiedliche zellbiologische Bedeutung hat.

#### 4.6 Prognostische und klinische Bedeutung von LGR5FL und der Spleißvariante LGR5Δ5

Die prognostische Relevanz der *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-Expression wurde für Patienten mit Weichteilsarkomen bzw. oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht. Insbesondere der mRNA-Gehalt der LGR5-Spleißvariante Δ5 stellte in beiden Tumorentitäten einen signifikanten Prognosemarker für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben dar. Zusätzlich zu den Untersuchungen auf mRNA-Niveau wurde das LGR5-Protein exemplarisch im normalen unverhornten Plattenepithel sowie im oralen Plattenepithelkarzinom mittels Immunhistochemie untersucht (Abb. 3.27). Es zeigte sich, dass LGR5-positive Zellen sowohl im normalen unverhornten Plattenepithel — auf das *stratum basale* begrenzt — und im oralen Plattenepithelkarzinom — difus im Tumorgewebe verteilt — nachweisbar sind.

In Weichteilsarkomen korreliert ein niedriger *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt signifikant mit einer schlechten Prognose. Ein niedriger *LGR5FL*-mRNA-Gehalt ist in Weichteilsarkompatienten nicht signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tabelle 3.3). Darüber hinaus korreliert ein niedriger mRNA-Gehalt von *LGR5 full length* ( $p=0,023$ ) bzw. *LGR5Δ5* ( $p=0,005$ ) mit einem höheren Tumorgrad. In Übereinstimmung damit beschrieben McClanahan und Kollegen, dass sowohl in Kolorektal- als auch in Ovarialkarzinomen die *LGR5*-Expression in Grad I- und Grad II-Tumoren höher war als in Grad III- und Grad IV-Tumoren. Die Autoren vermuteten daher eine Involvierung von LGR5 in frühe Prozesse der Tumorgenese (McClanahan et al. 2006). Im Weiteren konnte in einem murinen Endometriumtumormodell eine erhöhte *LGR5*-Expression im Epithel in der Initialphase der Tumorgenese beobachtet werden, während in fortgeschrittenen Tumoren die *LGR5*-Expression reduziert war (Sun et al. 2009). Eine Rolle von LGR5 bei der Initialisation von Kolorektaltumoren wurde ebenfalls diskutiert (Fan et al. 2010). Im Prozess der kolorektalen Tumorgenese erfolgt ein *shift* in der Verteilung der LGR5-positiven Zellen von der Lumenoberfläche hin zum Kryptengrund. Dabei korreliert eine hohe LGR5-Expression an der Lumenoberfläche mit einem niedrigen Tumorgrad, während in fortgeschrittenen Tumoren eine hohe *LGR5*-Expression mit einem hohen Tumorgrad einhergeht (Takeda et al. 2011). Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Weichteilsarkompatienten stehen weitgehend im Einklang mit diesen Hypothesen. So hatten die WTS-Patienten mit einem niedrigeren Tumorgrad einen erhöhten tumoralen *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt. Ein niedriger tumoraler *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt korreliert in Weichteilsarkompatienten mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben ( $p=0,043$ ) und dem Auftreten von Fernmetastasen ( $p=0,025$ ).

In den oralen Plattenepithelkarzinomen sind im Vergleich zu den Weichteilsarkomen inverse Effekte zu beobachten. So ist ein hoher *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt im Tumor signifikant mit einem schlechteren Gesamt- ( $p=0,001$ ) und rezidivfreien ( $p=0,001$ ) Überleben assoziiert. Der mRNA-Gehalt der *full length* Variante hat in dieser Tumorentität keinen Einfluss auf die Prognose. In einer Studie an oralen Plattenepithelkarzinomen zeigte sich, dass der Anteil der LGR5-exprimierenden Zellen über den Prozess der malignen Transformation vom Normalgewebe des Mundes ausgehend über Dysplasien

(Tumorstufen) bis hin zu Plattenepithelkarzinomen anstieg. Eine Assoziation zwischen der LGR5-Proteinexpression (Immunhistochemie) und klinischen Parametern konnte jedoch nicht gefunden werden (Dalley *et al.* 2015). Die Untersuchung der LGR5-Expression erfolgte in der Studie mittels Immunhistochemie mit einem Antikörper, welcher alle LGR5-Varianten erkannte. Eine Differenzierung zwischen der *full length LGR5* und den LGR5 Spleißvarianten konnte deshalb nicht getroffen werden. Eine Korrelation zwischen einer hohen LGR5-Expression im Tumor und ungünstigen klinischen Parametern wurde für mehrere Tumorentitäten gezeigt. In Gliomen stieg die Zahl der LGR5-exprimierenden Zellen mit dem Tumorgrad an und korrelierte mit einem schlechteren Gesamtüberleben (Nakata *et al.* 2013). Im Lungenadenokarzinom korrelierte eine hohe LGR5-Expression mit der TumorgroÙe, einem höherem Tumorgrad und einer schlechten Prognose (Ryuge *et al.* 2013). Eine negative Assoziation zwischen hoher LGR5-Expression und Überleben wurde auch für Mammakarzinome gezeigt (Yang *et al.* 2015). In Kolonkarzinomen ist eine hohe LGR5-Expression mit einer schlechten Prognose (Takahashi *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012), Invasion und Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert (Wu *et al.* 2012). Im Einklang hierzu wurde in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen einem hohen LGR5 $\Delta$ 5-mRNA-Gehalt ( $p=0,02$ ) und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen für Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom beobachtet. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des LGR5FL-mRNA-Gehaltes und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen im oralen Plattenepithelkarzinom konnte dagegen nicht beobachtet werden. Uchida und Kollegen zeigten für Kolorektalkarzinome ebenfalls, dass eine hohe LGR5-Expression mit lymphatischer und vaskulärer Invasion einherging (Uchida *et al.* 2010). In Magentumoren korrelierte eine hohe LGR5-Expression mit lymphatischer Invasion, jedoch nicht mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Yamanoi *et al.* 2013).

Für die Patienten mit Weichteilsarkomen sowie mit oralen Plattenepithelkarzinomen wurde in dieser Arbeit die LGR5 Spleißvariante  $\Delta$ 5 als ein prognostischer Marker identifiziert, während die *full length* Variante keine prognostische Relevanz hatte. Die prognostische Bedeutung des LGR5 ist bereits für mehrere Tumorentitäten bekannt. Eine Differenzierung zwischen LGR5FL und den Spleißvarianten des LGR5 wurde in den bis dato durchgeführten Studien nicht durchgeführt, sodass es auch nicht ersichtlich ist, ob nur LGR5FL oder LGR5 (Gesamt) untersucht wurde. Die LGR5-Spleißvarianten wurden bis dato nicht separat untersucht. Für Genvarianten des LGR5 (SNP: *single-nucleotide polymorphism*) wurde jedoch eine prognostische Relevanz aufgezeigt. Für Patienten mit hereditären Kolonkarzinom Grad III und Hochrisiko Grad II, die mit einer 5-Fluorouracil (5-FU) basierenden Chemotherapie behandelt wurden, konnte ein reduziertes Rezidivrisiko nachgewiesen werden, wenn in mindestens einem der Allele des LGR5 der SNP LGR5 rs17109924 zu finden war (Gerger *et al.* 2011). Ohne adjuvante Chemotherapie hatte das SNP LGR5 rs17109924 in der untersuchten Patientengruppe keine prognostische Relevanz (Szkandera *et al.* 2015). In dem hier untersuchten Weichteilsarkomkollektiv wurde dieser SNP (LGR5 rs17109924) ebenfalls analysiert, wobei hier keine prognostische Relevanz nachgewiesen werden konnte. (Daten nicht gezeigt)

In dieser Arbeit ist auffällig, dass in oralen Plattenepithelkarzinomen ein hoher tumoraler *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt, in Weichteilsarkomen jedoch ein niedriger *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt, negativ mit prognostischen Parametern bzw. dem Überleben von Patienten assoziiert ist. In der aktuellen Literatur zeigt sich tumortyp- bzw. studienabhängig eine unterschiedliche klinische und prognostische Bedeutung des LGR5. Während LGR5 in mehreren Arbeiten als positiver Regulator des Wnt-Signalweges beschrieben wird, (McClanahan *et al.* 2006; Fan *et al.* 2010; Carmon *et al.* 2012) wurde LGR5 in Kolonkarzinomzelllinien dagegen als negativer Regulator des Wnt-Signalwegs dargestellt (Walker *et al.* 2011). Darüber hinaus zeigten in einer Studie höhergradige Dysplasien und Adenokarzinome der Speiseröhre eine höhere *LGR5*-Expression als Barrett's Ösophagus (Metaplasie) (Becker *et al.* 2010). In einer weiteren Arbeit wurde dagegen in den Barrett's Ösophagus eine höhere *LGR5*-Expression als im ösophagealen Adenokarzinom nachgewiesen (von Rahden, Burkhard H A *et al.* 2011).

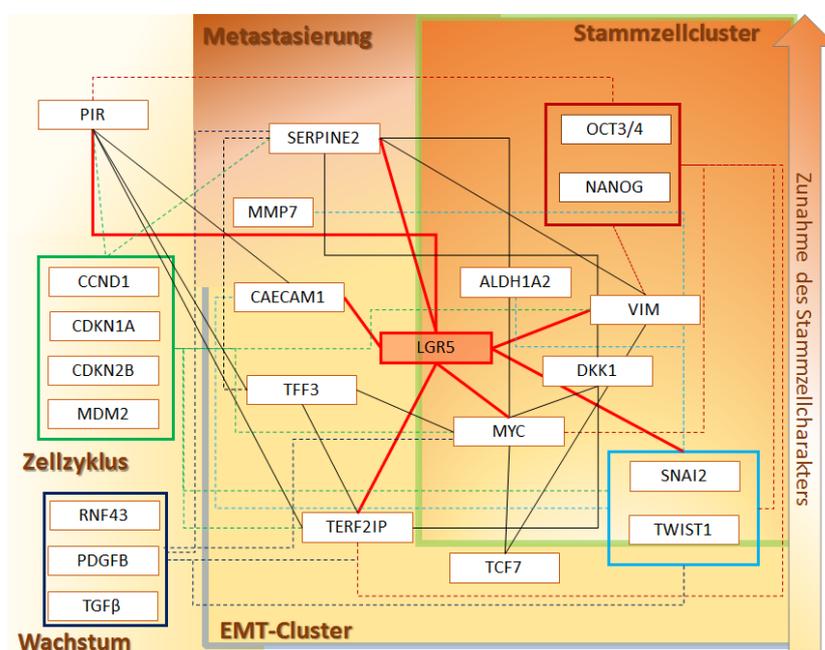
Ein Anstieg der *LGR5*-Expression vom Normalgewebe über Dysplasien (Tumorvorstufen) bis hin zum Karzinom wurde für Kolonkarzinome und orale Plattenepithelkarzinome beschrieben (Becker *et al.* 2010; Fan *et al.* 2010; Wu *et al.* 2012; Dalley *et al.* 2015). Vielfache Befunde zeigen eine Assoziation zwischen der *LGR5*-Expression und dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einem höheren Tumorgrad und aggressiverem Tumorverhalten (Scannell *et al.* 2013; Yamanoi *et al.* 2013; Ryuge *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014; Chen *et al.* 2014a). Im Einklang dazu zeigen die Untersuchungen in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen dem tumoralen *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalt und dem Gesamtüberleben, dem Rückfallrisiko und dem Auftreten von Metastasen. Diese Befunde deuten auf eine unmittelbare Beteiligung des LGR5 an den Prozessen der Metastasierung und der Tumorprogression hin.

#### 4.7 Einfluss der Modulation der *LGR5* Expression auf den mRNA-Gehalt ausgewählter EMT- und Stammzellmarker

Die Identifizierung der Gene, deren Expression durch LGR5 beeinflusst wird, könnte einen genaueren Einblick in die zelluläre Funktion dieses Proteins geben. Zu diesem Zweck wurden Microarray-Analysen (Kap. 2.2.2.8) nach Reduktion der *LGR5*-Expression durch shRNA sowie nach Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide in der Weichteilsarkomzelllinie RD, der Kolonkarzinomzelllinie HT29 und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durchgeführt. Die Expression der potenziellen *LGR5*-Zielgene wurde nachfolgend mittels quantitativer Taqman-Echtzeit-PCR (Kap. 2.2.2.6) nach Modulation der *LGR5*-Expression in den Zelllinien RD, HT29, MCF-7, SKLMS-1, SKBR3 und SF767 verifiziert. Es zeigte sich, dass sich die meisten durch die Microarray-Analysen ermittelten Gene bei der Untersuchung mittels quantitativer Taqman-Echtzeit-PCR als nicht durch LGR5-reguliert erwiesen. Der mRNA-Gehalt von lediglich sieben Genen ist deutlich mit dem *LGR5*-mRNA-Gehalt assoziiert. Die Gene *SERPINE2*, *TWIST1*, *SNAI2* und *MYC* werden nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA verstärkt exprimiert, während die Transduktion der *LGR5FL*- als auch *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide inverse Effekte verursacht. Der mRNA-Gehalt von *PIR*, *TERF2IP*, *VIM* (Vimentin) und *CAECAM1* ist nach

Reduktion der *LGR5*-Expression reduziert, während nach der Transduktion der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expressionsplasmide der mRNA-Gehalt dieser Gene erhöht ist (Abb. 3.21). Die Analyse der Genexpression von EMT- und Stammzellmarkern in Tumorproben der Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom zeigt ein abweichendes Bild. Hier korreliert der *LGR5*-mRNA-Gehalt positiv (je höher der *LGR5*-mRNA-Gehalt, desto höher der mRNA-Gehalt des untersuchten Gens) mit dem mRNA-Gehalt von *OPN*, *MMP7*, *CA2*, *Cyp4501B1*, *Cyclin D1 (CCND1)* sowie *OCT3/4*, *NANOG* und *TWIST1*, *SNAI1* sowie *TCF7*. Eine schematische Zusammenfassung der Gene, Gencluster und zellulärer Prozesse, mit denen *LGR5* in Beziehung steht, ist in der Abb. 4.3 für die *in vitro* gefundenen Zusammenhänge und in Abb. 4.4 für die *in vivo* nachgewiesenen Zusammenhänge dargestellt. Bei den meisten mit *LGR5*-korrelierten Genen handelt es sich um Wnt-Zielgene und/oder um Gene, die in die epithelial-mesenchymale Transition eingebunden sind. Die EMT wird vordergründig durch drei Gruppen von Transkriptionsregulatoren vermittelt, darunter *SNAI* (1 und 2) und *TWIST1*. *TWIST1* zählt zur Familie der basischen *helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Seine Aktivität wird durch eine Reihe verschiedener Signaltransduktionswege wie den Akt-, *STAT3*-, *MAPK*-, *TGFβ*- und Wnt-Signalweg reguliert. Nachdem *TWIST1* aktiviert wurde, inhibiert dieser Faktor die Transkription von E-Cadherin und erhöht die Expression von N-Cadherin sowie von Metalloproteasen (MMPs), welche über den Abbau der Extrazellulärmatrix die Motilität von Zellen fördern. Ferner wird *TWIST1* eine entscheidende Rolle bei der Generierung von Tumorstammzellen durch die Aktivierung der  $\beta$ -Catenin- und Akt-Signalwege zugeschrieben (Tania *et al.* 2014). *SNAI1* und *SNAI2* sind Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, welche durch direkte Bindung des E-Cadherin-Promotors, dessen Expression blockieren und somit Zellmigration, Invasion und Tumorprogression initiieren. Auch eine Regulation der Genexpression von Vimentin durch *SNAI2* wurde aufgezeigt (Cao *et al.* 2015). Eine Beteiligung von *SNAI1* und *SNAI2* in der Induktion und Aufrechterhaltung eines tumorstammzellähnlichen Charakters durch indirekte Aktivierung von Stammzellgenen wie *NANOG*, *OCT3/4* und *BMI1* wurde ebenfalls postuliert (Tania *et al.* 2014). Darüber hinaus reguliert *SNAI1* und *SNAI2* die Expression einer Vielzahl von Signalmolekülen wie EGF, FGF, *TGFβ*, BMPs, WNT, NOTCH oder Cytokinen. Diese Signalmoleküle können wiederum in *feedback loops* die Aktivierung von *SNAI1* und *SNAI2* vermitteln (Tania *et al.* 2014). So reguliert *AXIN2*, ein Suppressor und gleichzeitig ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges, die Aktivität von *SNAI1* hoch und induziert dadurch die EMT. *SNAI1* wiederum interagiert mit  $\beta$ -Catenin und vermittelt die Expression von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalweges und damit auch die Expression von *AXIN2*. Dies zeigt eine *feedback*-Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges durch aktiviertes *SNAI1* (Cao *et al.* 2015). Diese und eine Vielzahl weiterer Befunde zeigen die starke Überlappung zwischen dem EMT-Programm und der Wnt-Signalkaskade auf (Cao *et al.* 2015; Tania *et al.* 2014; Smith *et al.* 2009). So ist es nicht verwunderlich, dass die EMT-assoziierten Gene, deren mRNA-Gehalt in dieser Arbeit durch die Modulation der *LGR5*-Expression beeinflusst wird, gleichzeitig als Wnt-Zielgene beschrieben sind. Darunter sind *MYC* (He *et al.* 1998), *MMP7* (Brabletz *et al.* 1999), *NANOG* (Pereira *et al.* 2006), *OCT3/4* (Cole *et al.* 2008), *SNAI1/2* (Berge *et al.* 2008), *TWIST* (Howe *et al.* 2003) und Vimentin (Gilles *et al.* 2003). Der mRNA-Gehalt der Gene *SNAI2*, *TWIST1* und

*MYC in vitro* ist in dieser Arbeit negativ mit dem mRNA-Gehalt von *LGR5* assoziiert. Dies weist auf die Funktion des *LGR5* als Suppressor des kanonischen Wnt-Signalweges hin. In einer Arbeit an Kolonkarzinomzelllinien beschrieben Walker und Kollegen *LGR5* als einen Suppressor des Wnt-Signalweges und Antagonisten des EMT-Prozesses (Walker *et al.* 2011). Die Autoren fanden eine erhöhte Expression der Wnt-Zielgene und zugleich EMT-Regulatoren *ZEB*, *TWIST1*, *SNAI1* und *SNAI2* nach *LGR5 knockdown* bzw. inverse Effekte nach einer *LGR5*-Überexpression. Die Modulation der *LGR5*-Expression in diesen Kolonkarzinomzellen hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Expression oder auf die intrazelluläre Lokalisation der wichtigen EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Reduktion der *LGR5*-Expression zwar einen mesenchymalen Phänotyp verursachen kann, dass diese Transition jedoch nicht die klassischen Kennzeichen einer EMT aufweist (Walker *et al.* 2011).

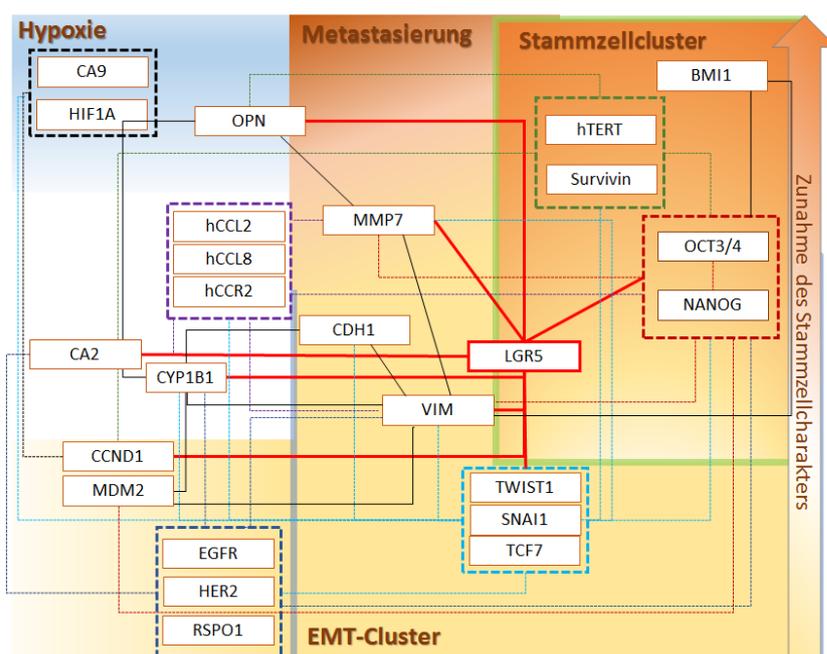


**Abb. 4.3: Schematische Darstellung der *LGR5*-assoziierten Genexpression *in vitro* in Zelllinien.** Über rote Linien sind die Gene mit *LGR5* verbunden, deren Expression (Taqman qPCR-Untersuchungen) signifikant durch die Modulation der *LGR5*-Expression beeinflusst wird. Über schwarze Linien sind Gene mit Genen und über gestrichelte Linien sind Gene mit Genclustern verbunden, deren Expressionen in Korrelationsanalysen nach Spearman miteinander signifikant assoziiert sind.

In dieser Arbeit korreliert der mRNA-Gehalt von Vimentin sowohl *in vitro* (Zelllinien) als auch *in vivo* (Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle) positiv mit dem *LGR5*-mRNA-Gehalt. Ein wie von Walker und Kollegen gezeigter Zusammenhang zwischen der Höhe der *LGR5*-Expression und dem E-Cadherin-mRNA-Gehalt ist in dieser Arbeit jedoch nicht zu beobachten. Außerdem hat die Modulation der *LGR5*-Expression keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation von Vimentin und E-Cadherin weder in adhärennten Zellen noch in Sphäroiden zur Folge (Daten nicht gezeigt).

In Untersuchungen an Kolonkarzinomzelllinien von Walker und Kollegen korrelierte die verstärkte Expression der Wnt-Zielgene und EMT-Marker nach *LGR5 knockdown* mit einer erhöhten Proliferation, Invasion, Metastasierung und Tumorigenität (Walker *et al.* 2011). Die zellbiologischen Daten aus

verschiedenen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs in der vorliegenden Arbeit sind uneinheitlich und stehen zum Teil in Widerspruch zu den Genexpressionsdaten. So bewirkt die Reduktion der *LGR5*-Expression eine verstärkte Expression der Wnt-Zielgene, führt jedoch zellbiologisch zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens in den WTS-Zelllinien RD und SKLMS-1 und der Keratinozytenzelllinie HaCaT sowie zu einer verringerten Migrationsrate der Kolonkarzinomzelllinie HT29. Somit supprimiert in dieser Arbeit *LGR5 in vitro* die Expression von Wnt-Zielgenen, fördert jedoch die Tumorprogression und Metastasierung. Dabei weisen zwei (WTS-Zelllinien RD und SKLMS-1) der drei Zelllinien, bei denen die Reduktion der *LGR5*-Expression eine Auswirkung auf das klonogene Zellüberleben hat, bereits einen mesenchymalen Charakter auf.



**Abb. 4.4:** schematische Darstellung der *LGR5*-assoziierten Genexpression in oralen Plattenepithelkarzinomproben. Über rote Linien sind die Gene mit *LGR5* verbunden, deren Expressionen in Korrelationsanalysen nach Spearman miteinander signifikant assoziiert sind. Über schwarze Linien sind Gene mit Genen und über gestrichelte Linien sind Gene mit Genclustern verbunden, deren Expressionen in Korrelationsanalysen nach Spearman miteinander signifikant in Wechselbeziehungen stehen.

Befunde, wonach *LGR5* als Wnt-Suppressor und EMT-Antagonist beschrieben wurden, sind in der Literatur selten. Allgemein wird *LGR5* als Aktivator des Wnt-Signalwegs beschrieben, welcher die Proliferation, Migration und Tumorigenität *in vitro* in verschiedenen Zelllinien fördert (Hiraoka *et al.* 2015; Liu *et al.* 2013b; Al-Kharusi, Manal R A *et al.* 2013). In Zervixkarzinomzelllinien führte eine erhöhte Expression von *LGR5* zu einer Steigerung der Expression der Wnt-Zielgene *MYC*, Cyclin D1 und  $\beta$ -Catenin sowie zu einer erhöhten Migrationsrate, Klonogenität und Tumorigenität der Zellen (Chen *et al.* 2014a). In dieser Arbeit lassen die Genexpressionsdaten *in vitro* eine Rolle des *LGR5* als Suppressor des Wnt-Signalweges vermuten, während die zellbiologischen Effekte für eine die Tumorprogression fördernde Rolle des *LGR5* sprechen.

Genexpressionsuntersuchungen in Zelllinien zeigten eine signifikante Assoziation zwischen dem *LGR5*-mRNA-Gehalt und dem mRNA-Gehalt von vier Genen (*SERPINE2*, *PIR*, *TERF2IP* und *CAECAM1*), welche

bis dato in der Literatur weder als Wnt-Zielgene noch als EMT-Marker beschrieben sind. Der extrazelluläre Serin-Protease-Inhibitor E2 (*SERPINE2*) gehört zu der Serpin-Superfamilie. Serpine werden ubiquitär im Gewebe exprimiert und sind in eine Vielzahl physiologischer Prozesse eingebunden, darunter Entzündungsprozesse, Tumorprogression und Metastasierung (Vaillant *et al.* 2015). Eine Assoziation mit dem Wnt-Signalweg wurde ebenfalls vermutet (Vaillant *et al.* 2015). In dieser Arbeit zeigt sich eine negative Assoziation des mRNA-Gehaltes von *SERPINE2* mit dem *LGR5*-mRNA-Gehalt. Damit wird *SERPINE2 in vitro* entsprechend den bekannten Wnt-Zielgenen *TWIST*, *MYC* und *SNAI2* reguliert. Dies erlaubt die Spekulation, dass *SERPINE2* direkt oder indirekt durch den Wnt-Signalweg reguliert werden könnte. Die Höhe des mRNA-Gehaltes der drei Gene *PIR*, *TERF2IP* und *CAECAM1* ist in dieser Arbeit positiv mit dem mRNA-Gehalt von *LGR5* assoziiert. Pirin (*PIR*; *iron-binding nuclear protein*) kodiert für ein Fe(II)-Kernprotein. Es wird ubiquitär exprimiert. Pirin fungiert als transkriptioneller Co-Faktor und reguliert so unter anderem *SNAI2* transkriptionell. Aktuelle Untersuchungen zeigen eine Involvierung von Pirin in die Tumormetastasierung über die Induktion der EMT jedoch unabhängig vom EMT-spezifischen Transkriptionsfaktor *SNAI2* (Komai *et al.* 2015). Es wäre möglich, dass Pirin durch *LGR5* ohne Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalweges beeinflusst wird. Dies wiederum würde die Spekulation erlauben, dass *LGR5* neben dem kanonischen Wnt-Signalweg auch über andere Signaltransduktionswege in die Regulation der EMT eingebunden sein könnte. *TERF2IP* (*telomeric repeat binding factor 2 (TRF2) interagierendes Protein*; *RAP1*) gehört zu dem Proteinkomplex, welcher die Länge der Telomere reguliert. Es wird vermutet, dass *TERF2IP* eine entscheidende Rolle bei der Initiation des transkriptionellen *silencing* an den Telomeren spielt (Patel *et al.* 2015). Die Aufrechterhaltung der Telomere ist entscheidend für die Immortalität sowohl von Stammzellen als auch von Tumorzellen (Antoine *et al.* 2005). Die Assoziation der *LGR5*-Expression mit der Expression von *TERF2IP* könnte ein weiterer Hinweis auf die bereits mehrfach postulierte Involvierung des *LGR5* in die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften sein. *CAECAM1* (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) ist ein Transmembranglykoprotein und gehört zur CEA-Familie (*carcinoembryonic antigen*) und der IgCAM-Superfamilie (*Immunoglobulin cell adhesions molecules*), einer großen Gruppe von Zelloberflächenglykoproteinen, die Zelladhäsion vermitteln. Dieses Protein ist an der apikalen Seite von polarisierten Epithelzellen, Leukozyten und Endothelzellen lokalisiert. *CAECAM1* ist in die Angiogenese, den Insulinmetabolismus und die Tumorgenese involviert und stellt einen Pathogenrezeptor dar. Es wurde eine Rolle von *CAECAM1* als Tumorsuppressor gezeigt (Kuespert *et al.* 2006). In seiner Funktion als Zelladhäsionsprotein könnte für *CAECAM1* auch hier eine Assoziation mit der EMT diskutiert werden.

In den Untersuchungen an den Proben der oralen Plattenepithelkarzinome hat ein erhöhter *LGR5*-mRNA-Gehalt einen negativen Einfluss auf die Prognose und korreliert positiv mit dem mRNA-Gehalt von Wnt-Zielgenen und EMT-Markern. Dies lässt eine mögliche Funktion des *LGR5* als Aktivator der Wnt-Signalkaskade und der EMT vermuten. Bei allen Genen, deren mRNA-Gehalt in den oralen Plattenepithelkarzinomproben mit dem *LGR5*-mRNA-Gehalt assoziiert ist, und die als EMT-Marker beschrieben sind, handelt es sich gleichzeitig auch um Wnt-Zielgene. Darunter sind *MMP7* (Brabletz *et*

al. 1999), *NANOG* (Pereira *et al.* 2006), *OCT3/4* (Cole *et al.* 2008), *SNAI1/2* (Berge *et al.* 2008), *TWIST* (Howe *et al.* 2003), *MYC* (He *et al.* 1998) und Vimentin (Gilles *et al.* 2003). Dies unterstützt zusätzlich die Vermutung, dass LGR5 in dieser Tumorentität über die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade die EMT beeinflusst. Darüber hinaus werden von LGR5 scheinbar weitere Wnt-Zielgene beeinflusst, deren Bedeutung für die EMT bis dato nicht beschrieben wurde. Darunter sind Cyclin D1 (Tetsu und McCormick 1999), Osteopontin (*OPN*) (Wai and Kuo 2008) und *TCF7* (Roose *et al.* 1999).

Die Analysen der Genexpression innerhalb dieser Arbeit zeigen eine auffällige Diskrepanz zwischen der *in vivo* und *in vitro* beobachteten Assoziation des mRNA-Gehaltes von *LGR5* mit dem von Wnt-Zielgenen. In adhärenter Zellkultur ist der mRNA-Gehalt der Wnt-Zielgene negativ mit dem *LGR5*-mRNA-Gehalt assoziiert, in Plattenepithelkarzinomproben (*in vivo*-Material) von Patienten hingegen positiv. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurden in Kolonkarzinomen Unterschiede in der *LGR5*-abhängigen Genexpression zwischen Zelllinien und Tumoren gezeigt (Hirsch *et al.* 2014). Während in Kolonkarzinomzelllinien die *LGR5*-Expression den Notch-Signalweg beeinflusste, war in Kolonkarzinomproben von Patienten eine *LGR5*-abhängige Aktivierung des Wnt-Signalweges zu beobachten. Die Autoren diskutierten diese Diskrepanz mit dem Fehlen der physiologischen Umgebung der Zellen in Zellkulturen (Hirsch *et al.* 2014).

Diese Daten verdeutlichen die Einbindung des *LGR5* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Prozesse der Proliferation, Metastasierung und EMT und stellen dessen Expression in Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters. Es zeigt auch, dass *LGR5* in Abhängigkeit von der physiologischen Umgebung der Zelle die Aktivität verschiedener Signaltransduktionswege beeinflussen kann. Diese Daten geben somit einen Hinweis darauf, dass *LGR5* kontextabhängig sowohl als Aktivator (*in vivo*) als auch als Suppressor (*in vitro*) der Wnt-Signalkaskade und des EMT-Programms fungieren könnte. So supprimiert in dieser Arbeit *LGR5* die Expression von Wnt-Zielgenen *in vitro*, fördert jedoch die Tumorprogression und Metastasierung. In oralen Plattenepithelkarzinomen *in vivo* wirkt *LGR5* dagegen scheinbar als Aktivator des kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs. Dabei ist eine erhöhte *LGR5Δ5*-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen mit negativen Parametern wie einer ungünstigen Prognose und Auftreten von Metastasen assoziiert. Somit fördert *LGR5* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Tumorprogression, unabhängig davon, wie es die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges beeinflusst.

#### 4.8 Endozytose und Inhibierung der Endozytose

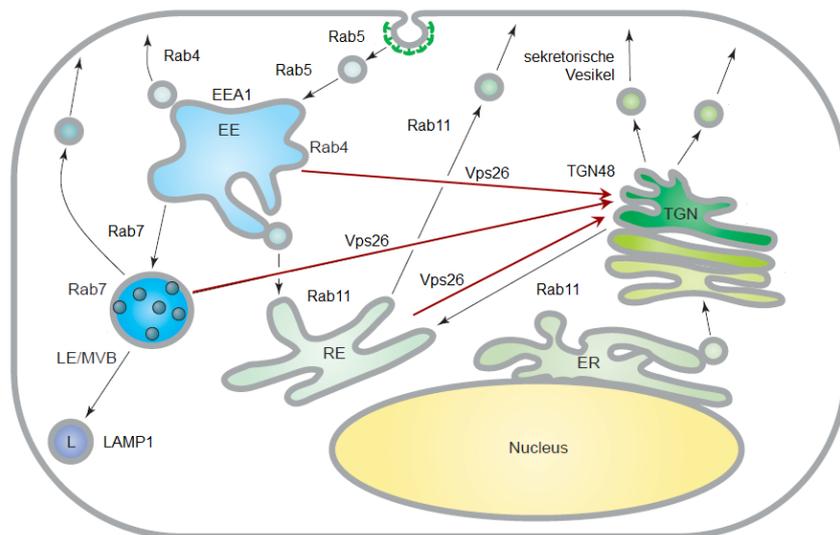
Die Internalisierung und der intrazelluläre Transport von GPCRs sind wichtige Prozesse, die sowohl die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und damit die Stimulierbarkeit der Zelle durch Liganden reguliert, als auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnimmt. Die Endozytose von GPCRs wird in der Regel durch die Agonist-abhängige Rekrutierung von Adaptorproteinen wie  $\beta$ -Arrestin vermittelt und führt mittels clathrinvermittelter Endozytose zum Entfernen des Rezeptors von der Zellmembran (Drake *et al.* 2006). Zudem wurde auch eine Agonist-unabhängige Internalisierung von konstitutiv aktivierten GPCRs beschrieben (Barak *et al.* 2001). Bei der Untersuchung der intrazellulären

Lokalisation des überexprimierten LGR5FL und LGR5Δ5 fiel auf, dass das überexprimierte LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein vollständig in vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert war (Abb. 3.7). Inwiefern es sich dabei um einen konstitutiven oder einen Liganden-abhängigen Prozess handelt, wurde in der Zelllinie HEK293T in sogenannten *pulse chase*-Experimenten unter definierten Kultivierungsbedingungen untersucht (siehe Kap. 3.15.1). Eine Membranlokalisation von überexprimiertem LGR5FL bzw. LGR5Δ5 ist dabei lediglich dann zu beobachten, wenn die Zellen direkt nach der Vitalfärbung bei 4 °C fixiert werden (Abb. 3.23). Bereits nach zwanzigminütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C ist das zuvor bei 4 °C markierte LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Protein wieder internalisiert und liegt somit in vesikulären Strukturen vor (Abb. 3.23). Diese rapide Internalisierung des überexprimierten LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteins ist bei Kultivierung ohne Zugabe von exogenen Agonisten (0,1 % FKS) sowie bei Kultivierung mit 10 % FKS bzw. Zugabe von 150 ng/ml RSPO1, WNT3A oder Co-Stimulation zu beobachten. Eine solch schnelle Internalisierung von LGR5FL in der Zelllinie HEK293T wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (Carmon *et al.* 2011; Carmon *et al.* 2012; Snyder *et al.* 2013b). Die Autoren stellten dabei fest, dass LGR5FL bereits in Abwesenheit eines exogenen Liganden internalisiert wurde. Daher spekulierten die Autoren, dass es sich bei dieser Art der LGR5-Internalisierung um einen Liganden-unabhängigen (konstitutiven) Vorgang handelt (Snyder *et al.* 2013b). Zudem wurde gezeigt, dass die Internalisierung des LGR5FL über die Serinreste an den Positionen 861 und 864 am C-Terminus (intrazelluläre Domäne) des LGR5 vermittelt wird. So blockierte der Austausch dieser Serine gegen Alanin die Internalisierung des LGR5FL in HEK293T-Zellen (Snyder *et al.* 2013b). Dieses Internalisierungsmotiv ist jedoch verschieden vom putativen β-Arrestin-Bindungsmotiv (Snyder *et al.* 2013b). Die Internalisierung von GPCRs wird üblicherweise durch die Bindung von β-Arrestin an das phosphorylierte β-Arrestin-Bindungsmotiv der GPCRs als Folge einer Ligandenbindung eingeleitet (Walther und Ferguson 2013). In *pulse chase*-Experimenten in dieser Arbeit wird die Spleißvariante LGR5Δ5 gleichermaßen wie die *full length* Variante internalisiert. Wie bereits in Kapitel 4.2 diskutiert unterscheidet sich die LGR5Δ5 Variante von LGR5FL lediglich im Fehlen der zwei von drei R-Spondin-Interaktionsstellen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Form der LGR5FL- und LGR5Δ5-Internalisierung R-Spondin unabhängig erfolgen könnte. Inwiefern es sich bei diesem Internalisierungsvorgang gänzlich um einen Liganden-unabhängigen Prozess handelt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden, da die Existenz weiterer LGR5-Agonisten, die möglicherweise auch mit der Δ5 Variante interagierten, nicht ausgeschlossen werden kann. So kann der positive Regulator des Wnt-Signalweges Norrin physiologisch mit LGR4 und LGR5 interagieren. Jedoch aktiviert lediglich die Bindung des Norrin an LGR4 den kanonischen Wnt-Signalweg im TOPFlash-Assay (Deng *et al.* 2013). Darüber hinaus zeigt die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung des mRNA-Profiles der HEK293T Zellen mittels qPCR einen hohen mRNA-Level der LGR5-Liganden R-Spondin 1-3. R-Spondin 4 mRNA war dagegen nicht detektierbar (Tabelle 7.20). Dies legt die Vermutung nahe, dass in der Zelllinie HEK293T ein hoher Grad an Autostimulation vorliegen könnte. In diesem Fall wäre die permanente Internalisierung von LGR5FL auf der Bindung von selbst sezernierten RSPOs zurückzuführen. Die Kultivierung der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T Zellen im

Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FKS bzw. nach alleiniger oder kombinierter Zugabe von 150 ng/ml WNT3A und RSPO1 hat in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Internalisierungsrate von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 (Abb. 3.23). Carmon und Kollegen zeigen dagegen, eine um das 2,5fache erhöhte Internalisierungsrate von LGR5FL in Folge einer simultanen Stimulierung der *LGR5FL* überexprimierenden HEK293T Zellen mit WNT3A und RSPO1 (in einer Konzentration von je 100 ng/ml), während die alleinige Stimulierung mit diesen Agonisten die Internalisierungsrate nicht beeinflusste (Carmon *et al.* 2012). Die Internalisierung der GPCRs kann clathrinvermittelt in sogenannten *clathrin coated pits* oder clathrinunabhängig vermittelt werden. Über welchen Mechanismus die Endozytose des LGR5FL und LGR5Δ5 erfolgt, wurde durch die Blockierung der jeweiligen Endozytosewege durch selektive Inhibitoren in den *LGR5FL* und *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T Zellen untersucht. Monodanycadaverin (MDC) inhibiert die Internalisierung des Ligand/Rezeptorkomplexes in Clathrinvesikel und damit die clathrinvermittelte Endozytose. Ein weiterer Inhibitor der clathrinvermittelten Endozytose ist das PitStop2 (Abcam). Filipin III ist ein Reagenz zur Inhibierung der caveolinabhängigen Endozytose. In dieser Arbeit führte die Inkubation der *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* überexprimierenden HEK293T Zellen mit Monodanycadaverin sowie mit PitStop2 zur kompletten Inhibierung der LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Internalisierung (Abb. 3.24). Die Behandlung mit Filipin III hat dagegen keinen Einfluss auf die Internalisierung von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 (Abb. 3.24). Dies zeigt, dass sowohl die *full length* als auch die Δ5 Variante des LGR5 ausschließlich clathrinvermittelt internalisiert werden. Eine clathrinvermittelte Internalisierung des LGR5FL wurde ebenfalls von Carmon und Kollegen gezeigt (Carmon *et al.* 2012).

Die Internalisierung von GPCRs in zytoplasmatischen Vesikeln stellt den ersten Schritt im Endozytoseweg dar. Im nächsten Schritt fusionieren diese sowohl durch clathrinvermittelte als auch clathrinunabhängige Endozytose gebildete Vesikel mit/zu frühen Endosomen (auch als *early sorting endosoms* bezeichnet). Von den frühen Endosomen aus erfolgt die Verteilung der Membranproteine und Cargomoleküle. Der endosomale Transport wird durch eine Reihe von Rab-Proteinen (kleine GTP-bindende Proteine der Ras Superfamilie) kontrolliert. Jedes GTP-gebundene Rab-Protein fungiert in einem spezifischen, endosomalen Kompartiment und rekrutiert dort die für das jeweilige Kompartiment eigenen Effektorproteine. Von den frühen Endosomen (welche Rab5 enthalten) aus können die GPCRs im Prozess des schnellen Recyclings, Rab4-abhängig, sofort wieder an die Zelloberfläche transportiert werden. Alternativ können sie auch im Prozess des langsamen Recyclings über das Recycling-Kompartiment, Rab11 abhängig, an die Zellmembran transportiert werden. Alternativ können sie aber auch in den Endosomen verbleiben. Die Endosome durchlaufen dann einen Reifungsprozess zu Multivesikulärkörperchen (MVBs: *multivesikular bodies*) und späten Endosomen. Dieser Reifungsprozess von frühen zu späten Endosomen beinhaltet den Austausch von Rab5 gegen Rab7 und das Entlassen der endosomalen Kompartimentbestandteile, welche für das Recycling zuständig sind, sowie das stufenweise Ansäuern des Endosomlumens. Der Transport von Membranproteinen in das trans-Golgi (TGN: *trans golgi network*) als eine weitere Möglichkeit des Recyclings erfolgt aus frühen, seltener aus späten oder Recycling-Endosomen und wird über den

Retromer vermittelt. Die Fusion von späten Endosomen und MVBs mit Lysosomen, welche proteolytische Enzyme enthalten, vermitteln schließlich den Abbau der in ihnen angereicherten Proteine (Sorkin und Zastrow 2009; Trousdale und Kim 2015).



**Abb. 4.5: Intrazelluläre Transportwege von Zellmembranrezeptoren.** Es sind intrazelluläre Endozytosekompartimente mit den typischen Markern dargestellt, zu denen GPCRS nach clathrinvermittelter Internalisierung von der Plasmamembran gebracht werden können. Mit braunen Pfeilen ist der Retromer-Transport zum trans-Golgi (TGN) dargestellt. Bild (Gáborik und Hunyady 2004).

Die Lokalisation von LGR5FL und LGR5Δ5 in verschiedenen Endozytosekompartimenten (frühe Endosomen, Recycling-Endosomen, Lysosomen und trans-Golgi) wurde in dieser Arbeit sowohl im *steady state*-Zustand, durch das Anfärben des gesamten überexprimierten LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Proteins als auch zeitlich abhängig in *pulse chase*-Experimenten in LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden HEK293T Zellen untersucht. Für die Markierung der verschiedenen Endozytosekompartimente wurden jeweils spezifische Marker herangezogen: EEA1 (frühe Endosome), Rab11 (Recycling-Endosome), LAMP1 (Lysosome) und TGN48 (trans-Golgi). Unter normalen Kultivierungsbedingungen (10 % FKS) der LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden HEK293T Zellen ist im *steady state*-Zustand eine deutliche Co-Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 mit EEA1 (frühe Endosome) und TGN48 (trans-Golgi) zu beobachten. Eine Co-Lokalisation von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 mit Rab11 (Recycling Endosome) und LAMP1 (Lysosome) ist dagegen nicht nachweisbar. Die Kultivierung der LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden HEK293T Zellen im Kulturmedium mit 0,1% FKS oder Zugabe exogener Liganden RSPO1 und WNT3A, hat keinen Einfluss auf die Verteilung von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in den verschiedenen Endozytosekompartimenten (Abb. 3.25; Abb. 3.26; Abb. 7.5; Abb. 7.6). In *pulse chase*-Experimenten ist unter normalen Kultivierungsbedingungen (10 % FKS) der LGR5FL bzw. LGR5Δ5 überexprimierenden HEK293T Zellen eine vollständige Translokation des LGR5FL bzw. LGR5Δ5 von der Membran in die frühen Endosome (EEA1) fünfzehn Minuten nach dem Puls (Markierung des membranständigen Myc-Tag gekoppelten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Myc-Tag-Antikörper) zu beobachten. Eine Co-Lokalisation des fluoreszenzmarkierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 mit EEA1 (frühe Endosome) 120 Minuten nach Pulsgabe

ist nur noch vereinzelt zu finden. Die Gesamtmenge des fluoreszenzmarkierte LGR5FL bzw. LGR5Δ5 hat zu diesem Zeitpunkt (120 Minuten) im Vergleich zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Pulsgabe leicht abgenommen (Abb. 7.7; Abb. 7.8). Eine Co-Lokalisation des markierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 mit LAMP1 (Lysosome), Rab11 (Recycling Endosome) und TGN48 (trans-Golgi) ist zu keinem Zeitpunkt nach dem Puls zu beobachten. Auch in *pulse chase*-Experimenten hat die Zugabe der exogenen Liganden RSPO1 und WNT3 keinen Einfluss auf die Verteilung von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 in den Endozytosekompartimenten (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Rezeptoren LGR5FL bzw. LGR5Δ5 nach der Internalisierung von der Zellmembran mittels clathrinvermittelter Endozytose in die frühen Endosomen transportiert werden. Ein Transport der internalisierten Proteine in Recycling-Endosome, Lysosome oder zum trans-Golgi konnte nicht nachgewiesen werden. Bei dem im trans-Golgi im *steady state*-Zustand detektierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 handelt es sich um neu synthetisierte Rezeptoren, da in den *pulse chase*-Experimenten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 zu keinem Zeitpunkt im trans-Golgi Apparat detektierbar sind. Darüber hinaus wurde das internalisierte LGR5FL bzw. LGR5Δ5 scheinbar teilweise degradiert, da 120 Minuten nach Pulsgabe die Gesamtmenge des markierten LGR5FL bzw. LGR5Δ5 im Vergleich zu 15 Minuten nach Pulsgabe abnahm. Analog dazu beobachteten Carmon und Kollegen 120 min nach dem Puls in über 90 % der LGR5FL überexprimierenden HEK293T Zellen eine Rezeptordegradation (Carmon *et al.* 2012).

Der endosomale Transportweg des überexprimierten LGR5FL wurde auch von Snyder und Kollegen in HEK293T Zellen untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten sie, dass LGR5FL, nachdem es von der Membran internalisiert wurde, zunächst in frühen Endosomen lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde eine sehr schwache und transiente Co-Lokalisation zwischen LGR5FL und den Markern für langsame Recycling Endosome (Rab11) und für späte Endosome (Rab7 und Rab9) beobachtet. Die Autoren spekulierten, dass sich in den späten Endosomen die für den lysosomalen Abbau bestimmte LGR5FL-Proteinfraktion befindet (Snyder *et al.* 2013b). Im Gegensatz zu dieser Arbeit beobachteten Snyder und Kollegen jedoch, dass LGR5FL im Wesentlichen direkt, retromerabhängig zum trans-Golgi transportiert wird (Snyder *et al.* 2013b).

Inwiefern die Internalisierung des LGR5 für die Vermittlung des kanonischen Wnt-Signals notwendig ist, ist zurzeit noch unklar. In einer Studie blockierte die Überexpression einer dominant negativen Form des Dynamin zwar effizient die Endozytose des LGR5FL, hatte jedoch keinen Einfluss auf die RSPO1/LGR5-induzierte Verstärkung der TOPFlash-Aktivität. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die LGR5-Internalisierung für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges nicht essentiell ist (Carmon *et al.* 2012). Für das LGR5-Homolog LGR4 wurde jedoch gezeigt, dass eine clathrinvermittelte Co-Internalisierung des LGR4 mit RSPO3 essentiell für die nukleare  $\beta$ -Catenin-Akkumulation und damit für die Vermittlung des kanonischen Wnt-Signals war (Glinka *et al.* 2011).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die Änderung der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expression auf das zellbiologische Verhalten und das Genexpressionsprofil verschiedener Tumorzelllinien hat. Im Weiteren wurde die prognostische Bedeutung von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* für Patienten mit einem Weichteilsarkom bzw. einem oralen Plattenepithelkarzinom untersucht.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Modulation der *LGR5*-Expression zelllinienabhängig unterschiedliche Effekte hervorruft. In der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 und der Glioblastomzelllinie SF767 hat eine veränderte *LGR5*-Expression keinen Einfluss auf das zellbiologische Verhalten. In den Weichteilsarkomzelllinien SKLMS-1 und RD bewirkt eine Reduktion der *LGR5*-Expression eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, während eine *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression (SKLMS-1) keinen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben hat. In Sphäroidkulturen dieser WTS-Zelllinien ist nach Reduktion der *LGR5*-Expression eine Auflockerung der Sphäroidstruktur zu beobachten. Eine *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression (SKLMS-1) hat auf die Sphäroidbildungsfähigkeit der WTS-Zelllinie keinen Einfluss. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 führt die Reduktion der *LGR5*-Expression zur Verringerung der Migrationsrate, während nach einer *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression die Migrationsrate gesteigert wird. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 resultiert die Transduktion sowohl von *LGR5FL*- als auch von *LGR5Δ5*-Expressionsplasmiden in der Ausbildung von Hohlräumen innerhalb der kultivierten Sphäroide. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT (Normalzelllinie) verursacht sowohl die Reduktion als auch die Überexpression von *LGR5* gleichartige Effekte. So ist jeweils eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, eine erhöhte Migrationsrate sowie eine Verringerung der Sphäroidgröße zu beobachten. Dennoch wird die Expression verschiedener EMT-Marker und Wnt-Zielgene in dieser Zelllinie (HaCaT) nach Reduktion der *LGR5*-Expression diametral zu den Effekten einer *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression reguliert. Die Expression von einigen EMT- und Wnt-Zielgenen wird in allen untersuchten Zelllinien durch die Reduktion der *LGR5*-Expression verstärkt, während die Überexpression von *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5* einen entgegengesetzten Effekt hat. Die Überexpression der Spleißvariante  $\Delta 5$  hat ähnliche zellbiologische Effekte und Genexpressionsmuster zur Folge wie die Überexpression der *full length* Variante, obwohl dieser Variante die postulierte Ligandenbindestelle für RSPO größtenteils fehlt. Die TOPFlash-Untersuchungen zeigen, dass die Modulation der *LGR5*-Expression unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges sowohl ohne Stimulierung als auch nach Stimulierung mit RSPO1 und WNT3A hat.

Die *in vivo* Analysen zeigen sowohl für Weichteilsarkompatienten als auch für Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom unterschiedliche prognostische Bedeutung der beiden *LGR5* Varianten. Während der mRNA-Level von *LGR5Δ5* als ein prognostischer Marker sowohl für Patienten mit einem Weichteilsarkom als auch für Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom identifiziert werden konnte, ist der prognostische Wert der *full length* Variante jeweils nicht signifikant und somit nicht eindeutig nachweisbar. In Patientenproben der

oralen Plattenepithelkarzinome kann im Gegensatz zu den Resultaten *in vitro* jeweils eine positive Korrelation zwischen dem *LGR5FL*- sowie dem *LGR5Δ5*-mRNA-Level mit einer erhöhten Expression von Wnt-Zielgenen und EMT-Genen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen des Internalisierungsverhaltens von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* zeigen, dass beide Rezeptoren clathrinvermittelt internalisiert und zu frühen Endosomen transportiert werden. Die Reduktion der Gesamtproteinmenge beider fluoreszenzmarkierter Rezeptoren 120 Minuten nach einem Puls (*pulse chase*-Experimente) spricht für eine anschließende, zumindest teilweise Degradation der Proteine. Darüber hinaus weist die  $\Delta 5$  Variante das gleiche Internalisierungsverhalten auf wie die *LGR5 full length* Variante.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Einbindung des *LGR5* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Prozesse der Proliferation, Metastasierung und EMT. Darüber hinaus stellen sie die Expression von *LGR5* in Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters. Zudem zeigt sich eine starke Abhängigkeit der *LGR5*-Funktion vom zellulären Kontext.

Nach der Überexpression von *LGR5Δ5* wurden meist ähnliche zellbiologische Effekte beobachtet wie nach der Überexpression der *full length* Variante und dies obgleich *LGR5Δ5* das postulierte *RSPO*-Bindungsinterface größtenteils fehlt. Durch die Messung der TOPFlash-Aktivität in Abhängigkeit von der *RSPO1*-Konzentration als Dosis-Wirkungszusammenhang sollte geklärt werden, inwiefern die  $\Delta 5$ -Variante ebenfalls die *RSPO*-abhängige Potenzierung des kanonischen Wnt-Signalweges vermitteln kann. Darüber hinaus sollte mittels Dimerisierungsmotiv-Mutanten untersucht werden, inwiefern *LGR5Δ5* und *LGR5FL* in Proteininteraktionsstudien dimerisieren können und inwiefern eine Dimerisierung für *LGR5*-vermittelte Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalweges im TOPFlash-Assay notwendig ist.

Die Zelllinie HEK293T, in welcher die Internalisierung von *LGR5FL* und *LGR5Δ* untersucht wurde, exprimieren *R-Spondine* endogen auf hohem Niveau. Daher sollte untersucht werden, ob *LGR5FL* und *LGR5Δ5* ohne endogene *RSPO*-Expression mit vergleichbarer Geschwindigkeit internalisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, inwieweit die Dimerisierung der *LGR5*-Rezeptoren die Internalisierung des Rezeptors beeinflusst.

Weiterhin könnten *deep sequencing*-Analysen nach Modulation der *LGR5FL*- bzw. *LGR5Δ5*-Expression in Sphäroidkultur zeigen, ob und inwiefern sich die Genexpressionsprofile in 2D- und 3D-Kulturen unterscheiden.

Schlussendlich sollte die in *in vivo* auf mRNA-Ebene beobachtete prognostische Bedeutung der *LGR5Δ5* Variante für Weichteilsarkom- und Plattenepithelkarzinompatienten auch auf Proteinniveau nachvollzogen werden. Zusätzlich würden immunhistochemische Untersuchungen der Expression und zellulären Lokalisation von Wnt-Effektoren wie  $\beta$ -Catenin und EMT-Markern wie E-Cadherin in den Tumorproben Einblicke in eine mögliche Involvierung von *LGR5* in die Prozesse der EMT geben.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1 Publikationen

- Ailles, L. E. & Weissman, I. L. 2007: Cancer stem cells in solid tumors. *Current opinion in biotechnology* 18, 460–466.
- Al-Kharusi, Manal R A, Smartt, Helena J M, Greenhough, A., Collard, T. J., Emery, E. D., Williams, A. C. & Paraskeva, C. 2013: LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE2: implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs. *Carcinogenesis* 34, 1150–1157.
- Al-Sarraf, M. 2002: Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review. *Cancer control journal of the Moffitt Cancer Center* 9, 387–399.
- Anastas, J. N. & Moon, R. T. 2013: WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature reviews. Cancer* 13, 11–26.
- Angers, S. & Moon, R. T. 2009: Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 468–477.
- Antoine, K., Ferbus, D., Kolahgar, G., Prospéri, M.-T. & Goubin, G. 2005: Zinc finger protein overexpressed in colon carcinoma interacts with the telomeric protein hRap1. *Journal of cellular biochemistry* 95, 763–768.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. & Ferris, R. L. 2008: Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695–1709.
- Attwood, T. K. & Findlay, J. B. 1994: Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering* 7, 195–203.
- Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A. & Caron, M. G. 2001: Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 93–98.
- Barker, N. & Clevers, H. 2007: Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology* 133, 1755–1760.
- Barker, N. & Clevers, H. 2010: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138, 1681–1696.
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, Marc, Begthel, H., van den Born, Maaïke, Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J. & Clevers, H. 2009: Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.
- Barker, N., Rookmaaker, M. B., Kujala, P., Ng, A., Leushacke, M., Snippert, H., van de Wetering, Marc, Tan, S., van Es, J. H., Huch, M., Poulson, R., Verhaar, M. C., Peters, P. J. & Clevers, H. 2012: Lgr5(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development. *Cell reports* 2, 540–552.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, Maaïke, Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. 2007: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007.
- Battula, V. L., Evans, K. W., Hollier, B. G., Shi, Y., Marini, F. C., Ayyanan, A., Wang, R.-Y., Brisken, C., Guerra, R., Andreeff, M. & Mani, S. A. 2010: Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 1435–1445.

- Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Hapfelmeier, A., Ott, K., Novotny, A., Höfler, H. & Keller, G. 2012: Expression profiling of stem cell-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: a NOTCH2, GSK3B and  $\beta$ -catenin gene signature predicts survival. *PLoS one* 7, e44566.
- Becker, L., Huang, Q. & Mashimo, H. 2010: Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Diseases of the esophagus official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E* 23, 168–174.
- Berge, D. ten, Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E. & Nusse, R. 2008: Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell stem cell* 3, 508–518.
- Bertram, J. S. 2000: The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine* 21, 167–223.
- Binnerts, M. E., Kim, K.-A., Bright, J. M., Patel, S. M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J. M., Liu, Y., Lomas, W. E., Dixon, M., Hazell, S. A., Wagle, M., Nie, W.-S., Tomasevic, N., Williams, J., Zhan, X., Levy, M. D., Funk, W. D. & Abo, A. 2007: R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14700–14705.
- Bonnet, D. & Dick, J. E. 1997: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730–737.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N. E. 1988: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* 106, 761–771.
- Brabletz, T. 2012: To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nature reviews. Cancer* 12, 425–436.
- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. & Kirchner, T. 2005: Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells, tissues, organs* 179, 56–65.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. & Kirchner, T. 1999: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology* 155, 1033–1038.
- Cadigan, K. M. & Peifer, M. 2009: Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002881.
- Cao, H., Xu, E., Liu, H., Wan, L. & Lai, M. 2015: Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathology, research and practice* 211, 557–569.
- Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. & Liu, Q. 2011: R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11452–11457.
- Carmon, K. S., Lin, Q., Gong, X., Thomas, A. & Liu, Q. 2012: LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Molecular and cellular biology* 32, 2054–2064.
- Celià-Terrassa, T., Meca-Cortés, O., Mateo, F., Paz, A. M. de, Rubio, N., Arnal-Estapé, A., Ell, B. J., Bermudo, R., Díaz, A., Guerra-Rebollo, M., Lozano, J. J., Estarás, C., Ulloa, C., Álvarez-Simón, D., Milà, J., Vilella, R., Paciucci, R., Martínez-Balbás, M., Herreros, A. G. de, Gomis, R. R., Kang, Y., Blanco, J., Fernández, P. L. & Thomson, T. M. 2012: Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *The Journal of clinical investigation* 122, 1849–1868.
- Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. 2011: A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)* 331, 1559–1564.

- Chen, P.-H., Chen, X., Lin, Z., Fang, D. & He, X. 2013: The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes & development* 27, 1345–1350.
- Chen, Q., Cao, H.-Z. & Zheng, P.-S. 2014a: LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 5, 9092–9105.
- Chen, X., Wei, B., Han, X., Zheng, Z., Huang, J., Liu, J., Huang, Y. & Wei, H. 2014b: LGR5 is required for the maintenance of spheroid-derived colon cancer stem cells. *International journal of molecular medicine* 34, 35–42.
- Cheng, H. & Leblond, C. P. 1974: Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *The American journal of anatomy* 141, 503–519.
- Christofori, G. 2006: New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444–450.
- Clevers, H. 2006: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Clevers, H. 2011: The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* 17, 313–319.
- Clevers, H. & Nusse, R. 2012: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.
- Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H. & Young, R. A. 2008: Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes & development* 22, 746–755.
- Craene, B. de & Berx, G. 2013: Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews. Cancer* 13, 97–110.
- Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. 2007: Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine* 58, 267–284.
- Dalley, A. J., Abdul Majeed, A. A., Pitty, L. P., Major, A. G. & Farah, C. S. 2015: LGR5 expression in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 119, 436-40.e1.
- Deng, C., Reddy, P., Cheng, Y., Luo, C.-W., Hsiao, C.-L. & Hsueh, A. J. W. 2013: Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *Journal of cell science* 126, 2060–2068.
- Dick, J. E. 2008: Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.
- Dolan, M. E., Stine, L., Mitchell, R. B., Moschel, R. C. & Pegg, A. E. 1990: Modulation of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in vivo by O6-benzylguanine and its effect on the sensitivity of a human glioma tumor to 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Cancer communications* 2, 371–377.
- Drake, M. T., Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. 2006: Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation research* 99, 570–582.
- Ebber, J. D., Treisman, D. M., Zorniak, M., Kutty, R. G., Clark, P. A. & Kuo, J. S. 2010: The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert opinion on therapeutic targets* 14, 621–632.
- Fafulek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Sloncova, E., Huranova, M., Stancikova, J., Hlavata, A., Svec, J., Sedlacek, R., Luksan, O., Oliverius, M., Voska, L., Jirsa, M., Paces, J., Kolar, M., Krivjanska, M., Klimesova, K., Tlaskalova-Hogenova, H. & Korinek, V. 2013: Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with lgr5 to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology* 144, 381–391.
- Fan, X.-S., Wu, H.-Y., Yu, H.-P., Zhou, Q., Zhang, Y.-F. & Huang, Q. 2010: Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *International journal of colorectal disease* 25, 583–590.

- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. 2003: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63, 1256–1272.
- Gáborik, Z. & Hunyady, L. 2004: Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15, 286–293.
- Garcia, M. I., Ghiani, M., Lefort, A., Libert, F., Strollo, S. & Vassart, G. 2009: LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Developmental biology* 331, 58–67.
- Gerger, A., Zhang, W., Yang, D., Bohanes, P., Ning, Y., Winder, T., LaBonte, M. J., Wilson, P. M., Benhaim, L., Paez, D., El-Khoueiry, R., El-Khoueiry, A., Kahn, M. & Lenz, H.-J. 2011: Common cancer stem cell gene variants predict colon cancer recurrence. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6934–6943.
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P. & Foidart, J.-M. 2003: Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer research* 63, 2658–2664.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.-L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.-M. & Niehrs, C. 2011: LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports* 12, 1055–1061.
- Greaves, M. & Maley, C. C. 2012: Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000: The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P. M., Kirschner, M. W., Porter, J. A., Serluca, F. C. & Cong, F. 2012: ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200.
- Harris, J. F., Chambers, A. F., Hill, R. P. & Ling, V. 1982: Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 5547–5551.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1998: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, N.Y.)* 281, 1509–1512.
- Hermey, G., Methner, A., Schaller, H. C. & Hermans-Borgmeyer, I. 1999: Identification of a novel seven-transmembrane receptor with homology to glycoprotein receptors and its expression in the adult and developing mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 254, 273–279.
- Hintermann, E., Bilban, M., Sharabi, A. & Quaranta, V. 2001: Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin. *The Journal of cell biology* 153, 465–478.
- Hiraoka, K., Hayashi, T., Kaneko, R., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Kawasaki, Y. & Akiyama, T. 2015: SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. *Biochemical and biophysical research communications* 460, 216–221.
- Hirsch, D., Barker, N., McNeil, N., Hu, Y., Camps, J., McKinnon, K., Clevers, H., Ried, T. & Gaiser, T. 2014: LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 35, 849–858.
- Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J. & Brown, A. M. C. 2003: Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer research* 63, 1906–1913.

- Huch, M., Bonfanti, P., Boj, S. F., Sato, T., Loomans, C. J. M., van de Wetering, Marc, Sojoodi, M., Li, V. S. W., Schuijers, J., Gracanin, A., Ringnalda, F., Begthel, H., Hamer, K., Mulder, J., van Es, J. H., Koning, E. de, Vries, R. G. J., Heimberg, H. & Clevers, H. 2013a: Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *The EMBO journal* 32, 2708–2721.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S. F., van Es, J. H., Li, V. S. W., van de Wetering, Marc, Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M. J., Haft, A., Vries, R. G., Grompe, M. & Clevers, H. 2013b: In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
- Ilyas, M., Tomlinson, I. P., Rowan, A., Pignatelli, M. & Bodmer, W. F. 1997: Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10330–10334.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, Johan H, Snippert, H. J., Clevers, H. & Toftgård, R. 2008: Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics* 40, 1291–1299.
- Kageshita, T., Hamby, C. V., Ishihara, T., Matsumoto, K., Saida, T. & Ono, T. 2001: Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *The British journal of dermatology* 145, 210–216.
- Kahn, M. 2014: Can we safely target the WNT pathway? *Nature reviews. Drug discovery* 13, 513–532.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. 2009: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420–1428.
- Kemper, K., Prasetyanti, P. R., Lau, W. de, Rodermond, H., Clevers, H. & Medema, J. P. 2012: Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30, 2378–2386.
- Kleist, B., Xu, L., Kersten, C., Seel, V., Li, G. & Poetsch, M. 2012: Single nucleotide polymorphisms of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in primary and metastatic colorectal cancer. *American journal of translational research* 4, 279–290.
- Koivisto, L., Jiang, G., Häkkinen, L., Chan, B. & Larjava, H. 2006: HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha. *Experimental cell research* 312, 2791–2805.
- Kolakowski, L. F. 1994: GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels* 2, 1–7.
- Komai, K., Niwa, Y., Sasazawa, Y. & Simizu, S. 2015: Pirin regulates epithelial to mesenchymal transition independently of Bcl3-Slug signaling. *FEBS letters* 589, 738–743.
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., van de Wetering, Marc, van Es, Johan H, Mohammed, S., Heck, Albert J R, Maurice, M. M. & Clevers, H. 2012: Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665–669.
- Kreso, A. & Dick, J. E. 2014: Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell* 14, 275–291.
- Kristiansen, K. 2004: Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* 103, 21–80.
- Kuespert, K., Pils, S. & Hauck, C. R. 2006: CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current opinion in cell biology* 18, 565–571.
- Kumar, K. K., Burgess, A. W. & Gulbis, J. M. 2014: Structure and function of LGR5: an enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein science a publication of the Protein Society* 23, 551–565.

- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., Haeseler, A. von, Hobmayer, B., Martindale, M. Q. & Holstein, T. W. 2005: Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156–160.
- Kwon, M. S., Park, B.-o., Kim, H. M. & Kim, S. 2013: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5/GPR49 activates G12/13-Rho GTPase pathway. *Molecules and cells* 36, 267–272.
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. 2014: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 178–196.
- Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K. & Filipek, S. 2012: G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta biochimica Polonica* 59, 515–529.
- Lau, W. de, Barker, N., Low, T. Y., Koo, B.-K., Li, Vivian S W, Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P. J., van de Wetering, Marc, Stange, D. E., van Es, Johan E, Guardavaccaro, D., Schasfoort, Richard B M, Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, Albert J R & Clevers, H. 2011: Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293–297.
- Lau, W. de, Peng, W. C., Gros, P. & Clevers, H. 2014: The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & development* 28, 305–316.
- Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Maurice, M. M., Mahmoudi, T. & Clevers, H. 2012: Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245–1256.
- Liu, D., He, X. C., Qian, P., Barker, N., Trainor, P. A., Clevers, H., Liu, H. & Li, L. 2014: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled Receptor 5 marks short-term hematopoietic stem and progenitor cells during mouse embryonic development. *The Journal of biological chemistry* 289, 23809–23816.
- Liu, J., Gao, L., Zhang, H., Wang, D., Wang, M., Zhu, J., Pang, C. & Wang, C. 2013a: Succinate dehydrogenase 5 (SDH5) regulates glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -catenin-mediated lung cancer metastasis. *The Journal of biological chemistry* 288, 29965–29973.
- Liu, Y.-S., Hsu, H.-C., Tseng, K.-C., Chen, H.-C. & Chen, S.-J. 2013b: Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* 67, 791–799.
- Logan, C. Y. & Nusse, R. 2004: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781–810.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. 2009: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17, 9–26.
- Maelandsmo, G. M., Holm, R., Nesland, J. M., Fodstad, Ø. & Flørenes, V. A. 2003: Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 3383–3388.
- Malinauskas, T. & Jones, E. Y. 2014: Extracellular modulators of Wnt signalling. *Current opinion in structural biology* 29, 77–84.
- McClanahan, T., Koseoglu, S., Smith, K., Grein, J., Gustafson, E., Black, S., Kirschmeier, P. & Samatar, A. A. 2006: Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer biology & therapy* 5, 419–426.
- Morita, H., Mazerbourg, S., Bouley, D. M., Luo, C.-W., Kawamura, K., Kuwabara, Y., Baribault, H., Tian, H. & Hsueh, A. J. W. 2004: Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Molecular and cellular biology* 24, 9736–9743.

- Müller, D. J., Wu, N. & Palczewski, K. 2008: Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacological reviews* 60, 43–78.
- Nakamura, M. & Tokura, Y. 2011: Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *Journal of dermatological science* 61, 7–13.
- Nakata, S., Campos, B., Bageritz, J., Bermejo, J. L., Becker, N., Engel, F., Acker, T., Momma, S., Herold-Mende, C., Lichter, P., Radlwimmer, B. & Goidts, V. 2013: LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 23, 60–72.
- Ng, A., Tan, S., Singh, G., Rizk, P., Swathi, Y., Tan, T. Z., Huang, R. Y.-J., Leushacke, M. & Barker, N. 2014: Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nature cell biology* 16, 745–757.
- Niehrs, C. 2012: The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 767–779.
- Nowell, P. C. 1976: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)* 194, 23–28.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H.-F., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., Downey, R. J., Manova-Todorova, K., Brogi, E. & Massagué, J. 2011: Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine* 17, 867–874.
- Patel, T. N., Vasan, R., Gupta, D., Patel, J. & Trivedi, M. 2015: Shelterin proteins and cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP* 16, 3085–3090.
- Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. 2014: Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nature reviews. Drug discovery* 13, 497–512.
- Peng, W. C., Lau, W. de, Forneris, F., Granneman, Joke C M, Huch, M., Clevers, H. & Gros, P. 2013a: Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell reports* 3, 1885–1892.
- Peng, W. C., Lau, W. de, Madoori, P. K., Forneris, F., Granneman, Joke C M, Clevers, H. & Gros, P. 2013b: Structures of Wnt-antagonist ZNRF3 and its complex with R-spondin 1 and implications for signaling. *PloS one* 8, e83110.
- Pereira, L., Yi, F. & Merrill, B. J. 2006: Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Molecular and cellular biology* 26, 7479–7491.
- Pérez-Pomares, J. M. & Muñoz-Chápuli, R. 2002: Epithelial-mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *The Anatomical record* 268, 343–351.
- Pierce, G. B. & Speers, W. C. 1988: Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research* 48, 1996–2004.
- Plaks, V., Brenot, A., Lawson, D. A., Linnemann, J. R., van Kappel, E. C., Wong, K. C., Sauvage, F. de, Klein, O. D. & Werb, Z. 2013: Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell reports* 3, 70–78.
- Polakis, P. 2012: Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4. a008052
- Ponnusamy, M. P., Lakshmanan, I., Jain, M., Das, S., Chakraborty, S., Dey, P. & Batra, S. K. 2010: MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: a novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene* 29, 5741–5754.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M. & Morrison, S. J. 2008: Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593–598.
- Reya, T. & Clevers, H. 2005: Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850.

- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. 2001: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Rhim, A. D. 2013: Epithelial to mesenchymal transition and the generation of stem-like cells in pancreatic cancer. *Pancreatology official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 13, 114–117.
- Riede, U.-N. 1998: *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie: Pathologische Prinzipien - assoziierte Krankheiten - Folgezustände*. XXII, 484 S. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T. & Clevers, H. 1999: Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science (New York, N.Y.)* 285, 1923–1926.
- Roy, L. D., Sahraei, M., Subramani, D. B., Besmer, D., Nath, S., Tinder, T. L., Bajaj, E., Shanmugam, K., Lee, Y. Y., Hwang, S. I. L., Gendler, S. J. & Mukherjee, P. 2011: MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 30, 1449–1459.
- Ruffner, H., Sprunger, J., Charlat, O., Leighton-Davies, J., Grosshans, B., Salathe, A., Zietzling, S., Beck, V., Therier, M., Isken, A., Xie, Y., Zhang, Y., Hao, H., Shi, X., Liu, D., Song, Q., Clay, I., Hintzen, G., Tchorz, J., Bouchez, L. C., Michaud, G., Finan, P., Myer, V. E., Bouwmeester, T., Porter, J., Hild, M., Bassilana, F., Parker, C. N. & Cong, F. 2012: R-Spondin potentiates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. *PLoS one* 7, e40976.
- Ryuge, S., Sato, Y., Jiang, S.-X., Wang, G., Kobayashi, M., Nagashio, R., Katono, K., Iyoda, A., Satoh, Y. & Masuda, N. 2013: The clinicopathological significance of Lgr5 expression in lung adenocarcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 82, 143–148.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, Marc, Barker, N., Stange, D. E., van Es, Johan H, Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J. & Clevers, H. 2009: Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Scannell, C. A., Pedersen, E. A., Mosher, J. T., Krook, M. A., Nicholls, L. A., Wilky, B. A., Loeb, D. M. & Lawlor, E. R. 2013: LGR5 is Expressed by Ewing Sarcoma and Potentiates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Frontiers in oncology* 3, 81.
- Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H.-J., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A. L. & Weinberg, R. A. 2011: Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926–940.
- Schepers, A. G., Vries, R., van den Born, Maaïke, van de Wetering, Marc & Clevers, H. 2011: Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *The EMBO journal* 30, 1104–1109.
- Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. 2005: The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology* 142, 94–101.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R. & Morrison, S. J. 2009: Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822–829.
- Shi, F., Kempfle, J. S. & Edge, A. S. B. 2012: Wnt-responsive Lgr5-expressing stem cells are hair cell progenitors in the cochlea. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 9639–9648.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R. 1990: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107–1112.

- Smith, A. P., Verrecchia, A., Fagà, G., Doni, M., Perna, D., Martinato, F., Guccione, E. & Amati, B. 2009: A positive role for Myc in TGFbeta-induced Snail transcription and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 28, 422–430.
- Snippert, H. J., van der Flier, Laurens G, Sato, T., van Es, Johan H, van den Born, Maaïke, Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., van Rheenen, J., Simons, B. D. & Clevers, H. 2010: Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143, 134–144.
- Snyder, J. C., Rochelle, L. K., Barak, L. S. & Caron, M. G. 2013a: The stem cell-expressed receptor Lgr5 possesses canonical and functionally active molecular determinants critical to  $\beta$ -arrestin-2 recruitment. *PLoS one* 8, e84476.
- Snyder, J. C., Rochelle, L. K., Lyerly, H. K., Caron, M. G. & Barak, L. S. 2013b: Constitutive internalization of the leucine-rich G protein-coupled receptor-5 (LGR5) to the trans-Golgi network. *The Journal of biological chemistry* 288, 10286–10297.
- Sorkin, A. & Zastrow, M. von. 2009: Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 609–622.
- Sun, B., Ye, X., Li, Y. & Zhang, W. 2015: Lgr5 is a potential prognostic marker in patients with cervical carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 1783–1789.
- Szkandera, J., Herzog, S., Pichler, M., Stiegelbauer, V., Stotz, M., Schaberl-Moser, R., Samonigg, H., Asslaber, M., Lax, S., Leitner, G., Renner, W., Lenz, H.-J., Berghold, A. & Gerger, A. 2015: LGR5 rs17109924 is a predictive genetic biomarker for time to recurrence in patients with colon cancer treated with 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *The pharmacogenomics journal*. 15(5), 391-6.
- Takahashi, H., Ishii, H., Nishida, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y. & Mori, M. 2011: Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Annals of surgical oncology* 18, 1166–1174.
- Takeda, K., Kinoshita, I., Shimizu, Y., Matsuno, Y., Shichinohe, T. & Dosaka-Akita, H. 2011: Expression of LGR5, an intestinal stem cell marker, during each stage of colorectal tumorigenesis. *Anticancer research* 31, 263–270.
- Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D. & Kuo, P. C. 2012: Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3, 117–136.
- Tan, S. & Barker, N. 2015: Epithelial stem cells and intestinal cancer. *Seminars in cancer biology* 32, 40–53.
- Tanese, K., Fukuma, M., Yamada, T., Mori, T., Yoshikawa, T., Watanabe, W., Ishiko, A., Amagai, M., Nishikawa, T. & Sakamoto, M. 2008: G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation. *The American journal of pathology* 173, 835–843.
- Tania, M., Khan, M. A. & Fu, J. 2014: Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 7335–7342.
- Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X. & Heasman, J. 2005: Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 120, 857–871.
- Tetsu, O. & McCormick, F. 1999: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.

- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. 2009: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Trousdale, C. & Kim, K. 2015: Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *European journal of cell biology*. 94(11), 513-21.
- Uchida, H., Yamazaki, K., Fukuma, M., Yamada, T., Hayashida, T., Hasegawa, H., Kitajima, M., Kitagawa, Y. & Sakamoto, M. 2010: Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer science* 101, 1731–1737.
- Vaillant, C., Valdivieso, P., Nuciforo, S., Kool, M., Schwarzentruher-Schauerte, A., Méreau, H., Cabuy, E., Lobrinus, J. A., Pfister, S., Zuniga, A., Frank, S. & Zeller, R. 2015: Serpine2/PN-1 Is Required for Proliferative Expansion of Pre-Neoplastic Lesions and Malignant Progression to Medulloblastoma. *PloS one* 10, e0124870.
- van de Wetering, Marc, Sancho, E., Verweij, C., Lau, W. de, Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, Maaïke, Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. & Clevers, H. 2002: The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241–250.
- van der Flier, Laurens G, Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegerbarth, A., Palo, M. de, Anti, M., Van Gijn, Marielle E, Suijkerbuijk, S., van de Wetering, Marc, Marra, G. & Clevers, H. 2007: The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132, 628–632.
- van Hiel, M. B., Vandersmissen, H. P., van Loy, T. & Vanden Broeck, J. 2012: An evolutionary comparison of leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptors reveals a novel LGR subtype. *Peptides* 34, 193–200.
- van Loy, T., Vandersmissen, H. P., van Hiel, M. B., Poels, J., Verlinden, H., Badisco, L., Vassart, G. & Vanden Broeck, J. 2008: Comparative genomics of leucine-rich repeats containing G protein-coupled receptors and their ligands. *General and comparative endocrinology* 155, 14–21.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D. & Moon, R. T. 2003a: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Developmental cell* 5, 367–377.
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. & Moon, R. T. 2003b: Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Current biology CB* 13, 680–685.
- Vineis, P. & Berwick, M. 2006: The population dynamics of cancer: a Darwinian perspective. *International journal of epidemiology* 35, 1151–1159.
- Visser, K. E. de, Ciampricotti, M., Michalak, E. M., Tan, D. W.-M., Speksnijder, E. N., Hau, C.-S., Clevers, H., Barker, N. & Jonkers, J. 2012: Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *The Journal of pathology* 228, 300–309.
- von Rahden, Burkhard H A, Kircher, S., Lazariotou, M., Reiber, C., Stuermer, L., Otto, C., Germer, C. T. & Grimm, M. 2011: Lgr5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's esophagus? *Journal of experimental & clinical cancer research CR* 30, 23.
- Wai, P. Y. & Kuo, P. C. 2008: Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 27, 103–118.
- Walker, F., Zhang, H.-H., Odorizzi, A. & Burgess, A. W. 2011: LGR5 is a negative regulator of tumourigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PloS one* 6, e22733.

- Walther, C. & Ferguson, S. S. G. 2013: Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors. *Progress in molecular biology and translational science* 118, 93–113.
- Wang, B.-e., Wang, X., Long, J. E., Eastham-Anderson, J., Firestein, R. & Junttila, M. R. 2015: Castration-resistant Lgr5(+) cells are long-lived stem cells required for prostatic regeneration. *Stem cell reports* 4, 768–779.
- Wang, D., Huang, B., Zhang, S., Yu, X., Wu, W. & Wang, X. 2013: Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes & development* 27, 1339–1344.
- Wang, D., Zhou, J., Fan, C., Jiao, F., Liu, B., Sun, P., Miao, J. & Zhang, Q. 2014: Knockdown of LGR5 suppresses the proliferation of glioma cells in vitro and in vivo. *Oncology reports* 31, 41–49.
- Wang, Z. & Liu, C. 2015: Lgr5-Positive Cells are Cancer-Stem-Cell-Like Cells in Gastric Cancer. *Cellular physiology and biochemistry international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 36, 2447–2455.
- Wu, C., Xie, Y., Gao, F., Wang, Y., Guo, Y., Tian, H., Li, Y. & Fan, W. 2013: Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers. *Gene* 525, 18–25.
- Wu, X.-S., Xi, H.-Q. & Chen, L. 2012: Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World journal of surgical oncology* 10, 244.
- Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Fujii, G., Tsuiji, H., Kenetaka, K., Asaka, M. & Hirohashi, S. 2003: Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37, 528–533.
- Yamanoi, K., Fukuma, M., Uchida, H., Kushima, R., Yamazaki, K., Katai, H., Kanai, Y. & Sakamoto, M. 2013: Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathology international* 63, 13–19.
- Yang, L., Tang, H., Kong, Y., Xie, X., Chen, J., Song, C., Liu, X., Ye, F., Li, N., Wang, N. & Xie, X. 2015: LGR5 Promotes Breast Cancer Progression and Maintains Stem-Like Cells Through Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*.
- Zebisch, M. & Yvonne Jones, E. 2015: Crystal Structure of R-Spondin 2 in Complex with the Ectodomains of its Receptors LGR5 and ZNRF3. *Journal of structural biology*. 191, 149-55

## 6.2 Internetquellen

Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD)

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd_node.html) [8.02.2016]

the Wnt homepage

<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> [8.02.2016]

NCBI Conserved Domains

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> [8.02.2016]

NCBI Datenbank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> [8.02.2016]

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Aufschlüsselung der Gennamen soweit hier nicht vermerkt sind in Tabelle 3.1, Tabelle 3.2 und Tabelle 7.4 aufgelistet.

μ	micro
°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser
A	Amper
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Aqua Bidest	zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECD	<i>extra cellular damain</i>
et. al.	<i>et altera</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FZD	Freezled
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall

---

I	Liter
LB	Luria Bertani
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
nm	nanometer
M	Molar (mol/l)
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano
nt	Nukleotide
o.g.	oben genannt
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
sog.	so genannt
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure
U	unit
V	Volt
vs	<i>versus</i>
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
WTS	Weichteilsarkom
zmol	zentimol

## 7.2 Oligonukleotide

Tabelle 7.1: Oligonukleotide für die Amplifikation und Klonierung von LGR5FL und LGR5Δ5

Gen	Primer	Sequenz 5'→3'	Orientierung	Lokalisation
<b>LGR5</b>	LGR5 full 207 fw	TGAGTTGCAGAAGCCCACG	sense	207-226
	LGR5 full 3137 rev	CCGAGTTTCACCTCAGCTCT	antisense	3116-3137
<b>LGR5</b>	LGR5 298 fw	CTACTTCGGGCACCATGGAC	sense	298-317
	LGR5 3106 rev	ACTGCTCTGATATACTCAATCTC	antisense	2982-3106
<b>LGR5</b>	Δ5 N-NotI-Myc	CTCCGCGGCCGCGAGCAGAACTCA TCTCAGAAGAGGATCTGGGCAGCTC	sense	
	Δ5 C-NotI	GAGCCGCGCCTTAGAGACATG	antisense	
<b>LGR5</b>	LGR5 1240 fw	CTTAGCCTCCGATCGCTGAA	sense	1503-1522
	LGR5 1353 rev	CGACAGGAGGTTGGACGATA	antisense	1616-1597

Tabelle 7.2: Oligonukleotide für Sequenzierungen

Target	Primer	Sequenz 5'→3'	Orientierung	Lokalisation
<b>T7 Promotor</b>	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	sense	
<b>CMV Promotor</b>	CMV	CGCAATGGGCGGTAGGCGTG	sense	
<b>LGR5</b>	LGR5 464	AAGACACGTACCCACAGAAG	sense	689-708
	LGR5 1240	CTTAGCCTCCGATCGCTGAA	sense	1503-1522
	LGR5 1632	CTTGAGGAAGACCTGAAAG	sense	1895-1914
	LGR5 2456	TTATCCTTCTGGTGGTAGTCC	sense	2719-2739

Tabelle 7.3: Oligonukleotide für quantitative SYBR-Green-Echtzeit-PCR

Gen	Primer	Sequenz 5'→3'	NCBI-Nr	Lokalisation
<b>CYP1B1</b>	1B1 fw	AACGTACCGGCCACTATCAC	NM_000104.3	1358-1377
	1B1 rev	CCACGACCGGATCCAATTCT		1496-1477
<b>CCND1</b>	CCND1f	GCCCGAGGAGCTGCTGCAAAT	NM_053056.2	608-628
	CCND1r	ATCGTGCGGGTCATTGCGG		686-667
<b>CD44</b>	CD44 fw 1693	CCCATTCGACAACAGGGACA	NM_000610.3	1693-1712
	CD44 rw 1742	TGGATGGCTGGTATGAGCTG		1742-1723
<b>EGFR</b>	EGFR-„all“ fw	TCAGCCTCCAGAGGATGTTC	NM_005228.3	392-411
	EGFR-„all“ rev	GTGTTGAGGGCAATGAGGAC		511-530
<b>GAPDH</b>	GAPDH 969fw	CACCCACTCCTCCACCTTTG	NM_002046.4	1041-1060

Gen	Primer	Sequenz 5'→3'	NCBI-Nr	Lokalisation
	GAPDH1078bw	CCACCACCCTGTTGCTGTAG		1131-1150
<b>hCCL2</b>	hCCL2-F	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC	NM_002982.3	65-84
	hCCL2-R	CAGATCTCCTGGCCACAAT		297-278
<b>hCCL8</b>	hCCL8-F	TCACCTGCTGCTTTAACGTC	NM_005623.2	550-569
	hCCL8-R	ATCCCTGACCCATCTCTCCT		691-710
<b>hCCR2</b>	hCCR2-F	TGCCTGACTCACACTCAAGG	NM_000647.4	152-171
	hCCR2-R	GGCTTCTCAGCAACTGAACC		378-397
<b>HER2</b>	Her2a+b772	GGCCGTGCTAGACAATGGAG	NM_004448.3	580-599
	Her2a+b906	GGGTTCCGCTGGATCAAGAC		695-714
<b>HPRT</b>	HPRT309	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	NM_000194.2	391-410
	<i>HPRT570</i>	<i>CTTGCGACCTTGACCATCTT</i>		652-633
<b>LGR5</b>	LGR5 1240 fw	CTTAGCCTCCGATCGCTGAA	NM_003667.3	1503-1522
	LGR5 1353 rv	CGACAGGAGGTTGGACGATA		1616-1597
<b>OPN</b>	OPNa fw323	ATCTCCTAGCCCCACAGAAT	NM_00104005 8.1	323-342
	OPNa rev508	CATCAGACTGGTGAGAATCATC		
	OPNb fw323	ATCTCCTAGCCCCACAGAC	NM_000582.2	323-341
	OPNb rev509	AAAATCAGTGACCAGTTCATCAG		
	OPNc fw246	TGAGGAAAAGCAGAATGCTG	NM_00104006 0.1	246-265
	OPNc rv377	GTCAATGGAGTCCTGGCTGT		
<b>RNF43</b>	RNF43 fw 1133	TGGAAGGTGTGTTTGCTGGT	NM_017763.4	1133-1152
	RNF43 rv 1272	ACTCTCCAGCTTGACGATGC		1272-1253
<b>RPII</b>	RPII fw 1358	CTTGCCCCGTGCCATGCAGA	NM_000937.4	1358-1377
	RPII rw 1440	CTCGCACCCGGCCTTCCTTG		1440-1421
<b>SNAI1</b>	SNAI1 fw 27	CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA	NM_005985.3	27-46
	SNAI1 rw 186	GGGCTGCTGGAAGGTAAACT		167-186
<b>SOX2</b>	SOX2 803 fw	GGATAAGTACACGCTGCCCCG	NM_003106.3	803-822
	SOX2 925 rv	ATGTGCGCGTAACTGTCCAT		925-906

Tabelle 7.4: Sonden für die quantitative Taqman-Echtzeit-PCR

<b>Gen</b>	<b>Genname</b>	<b>Sondenbezeichnung</b>
<b>ALDH1A2</b>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	Hs00180254_m1
<b>BIRC5</b>	baculoviral IAP repeat containing 5 (Survivin)	Hs03043574_m1
<b>BMI1</b>	Bone morphogenic factor 1	Hs00995519_g1
<b>CA2</b>	carbonic anhydrase II	Hs01070108_m1
<b>CA9</b>	carbonic anhydrase IX	Hs00154208_m1
<b>CDH1</b>	adherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Hs01023894_m1
<b>CDKN1A</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Hs00355782_m1
<b>CDKN2B</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (inhibits CDK4)	Hs00793225_m1
<b>CAECAM1</b>	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Hs00989786_m1
<b>MYC</b>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	Hs00153408_m1
<b>DKK1</b>	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	Hs00183740_m1
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs03929097_g1
<b>hTERT</b>	human telomerase reverse transcriptase	Hs00972656_m1
<b>LGR5</b>	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	Hs00969422_m1
<b>MDM2</b>	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	Hs01066930_m1
<b>MMP7</b>	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	Hs01042796_m1
<b>NANOG</b>	Nanog homeobox	Hs02387100_g1
<b>PDGFB</b>	platelet-derived growth factor beta polypeptide	Hs00966522_m1
<b>PIR</b>	pirin (iron-binding nuclear protein)	Hs01125822_m1
<b>POU5F1 (OCT3/4)</b>	POU class 5 homeobox 1	Hs04260367_gH
<b>SERPINE2</b>	serpin peptidase inhibitor (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	Hs00385730_m1
<b>SNAI2</b>	snail family zinc finger 1	Hs00950344_m1
<b>TCF7</b>	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	Hs00175273_m1
<b>TERF2IP</b>	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	Hs00430292_m1
<b>TFF3</b>	trefoil factor 3 (intestinal)	Hs00902278_m1
<b>TGFB1</b>	transforming growth factor, beta 1	Hs00998133_m1
<b>TWIST1</b>	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1	Hs01675818_s1
<b>VEGF<math>\alpha</math></b>	vascular endothelial growth factor A	Hs00900055_m1

Gen	Genname	Sondenbezeichnung
<b>VIM</b>	vimentin	Hs00185584_m1

### 7.3 TopFlash

**Tabelle 7.5: TopFlash in Zelllinien.** Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis des *ratios* nach Stimulation zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Stimulation)/*ratio* (Kontrolle)]. \*p≤0,05

Zelllinie	Stimulation	<i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	Standardabw eichung <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	p-Wert <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	<i>fold change</i> (Stimulation)	p-Wert <i>fold change</i> (Stimulation)
SKLMS-1	-	1,48	0,59	0,59		
	WNT3A	1,10	0,46	0,80	0,75	0,43
	RSPO1	1,17	0,40	0,72	0,79	0,49
	WNT3A+RSPO1	1,91	0,69	0,10	1,29	0,46
MCF-7	-	0,61	0,23	0,13		
	WNT3A	0,83	0,49	0,33	1,37	0,44
	RSPO1	0,94	0,69	0,49	1,55	0,39
	WNT3A+RSPO1	<b>10,17</b>	<b>6,65</b>	<b>0,01*</b>	<b>16,65</b>	<b>0,03*</b>
SF767	-	1,42	0,79	0,58		
	WNT3A	1,19	0,77	0,97	0,84	0,69
	RSPO1	1,13	0,64	0,85	0,80	0,59
	WNT3A+RSPO1	6,17	5,73	0,21	4,34	0,15
HaCaT	-	1,47	0,20	0,49		
	WNT3A	<b>2,59</b>	0,94	0,15	1,76	0,06
	RSPO1	1,83	0,65	0,33	1,25	0,33
	WNT3A+RSPO1	<b>7,97</b>	<b>3,71</b>	<b>0,003*</b>	<b>5,42</b>	<b>0,02*</b>
HT29	-	1,29	0,72	0,68		
	Wn3at	1,86	1,43	0,44	1,44	0,50
	RSPO1	<b>21,09</b>	<b>7,07</b>	<b>≤0,001*</b>	<b>16,32</b>	<b>0,002*</b>
	WNT3A+RSPO1	<b>229,89</b>	<b>94,14</b>	<b>0,01*</b>	<b>177,89</b>	<b>0,004*</b>
SKBR3	-	1,25	0,41	0,37		
	WNT3A	1,23	0,58	0,87	0,99	0,97
	RSPO1	<b>26,80</b>	<b>12,15</b>	<b>0,004*</b>	<b>21,50</b>	<b>0,01*</b>
	WNT3A+RSPO1	<b>41,23</b>	<b>19,40</b>	<b>0,03*</b>	<b>33,07</b>	<b>0,01*</b>
HEK	-	1,40	0,45	0,17		
	WNT3A	<b>20,14</b>	<b>7,90</b>	<b>0,004*</b>	<b>14,38</b>	<b>0,003*</b>
	RSPO1	<b>162,94</b>	<b>17,34</b>	<b>0,004*</b>	<b>116,33</b>	<b>≤0,001*</b>
	WNT3A+RSPO1	<b>91,68</b>	<b>43,09</b>	<b>0,02*</b>	<b>65,46</b>	<b>0,01*</b>
RD	-	2,45	2,02	0,49		
	WNT3A	<b>167,72</b>	<b>94,31</b>	<b>≤0,001*</b>	<b>68,51</b>	<b>0,01*</b>
	RSPO1	<b>12,33</b>	<b>9,38</b>	<b>0,01*</b>	5,04	0,08
	WNT3A+RSPO1	<b>496,88</b>	<b>336,57</b>	<b>0,01*</b>	<b>202,96</b>	<b>0,03*</b>

**Tabelle 7.6: TopFlash nach Modulation der LGR5-Expression in der Zelllinien MCF-7.** Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Stimulation zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Stimulation)/*ratio* (Kontrolle)]. Der *fold change* (LGR5-Modulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Reduktion der LGR5-Expression oder Überexpression von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Reduktion der LGR5-Expression/LGR5FL bzw. Δ5-Überexpression)/*ratio* (Kontrolle)]. \*p≤0,05

Zelllinie	Stimulation	<i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	Standardabweichung <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	p-Wert <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	<i>fold change</i> (Stimulation)	p-Wert <i>fold change</i> (Stimulation)	<i>fold change</i> (LGR5 Modulation)	p-Wert <i>fold change</i> (LGR5 Modulation)
MCF-7 LVKtr	-	0,93	0,47	0,98				
	WNT3A	1,30	0,69	0,98	1,40	0,41		
	RSPO1	1,06	0,36	0,92	1,14	0,68		
	WNT3A +RSPO1	<b>6,78</b>	<b>3,06</b>	<b>≤0,001*</b>	<b>7,29</b>	<b>0,01*</b>		
MCF-7 LGR5FL	-	0,72	0,34	0,74				
	WNT3A	0,96	0,34	0,94	1,33	0,36	0,73	0,40
	RSPO1	1,23	0,47	0,80	1,71	0,13	1,17	0,57
	WNT3A +RSPO1	<b>5,70</b>	<b>3,31</b>	<b>0,004*</b>	<b>7,90</b>	<b>0,03*</b>	0,84	0,70
MCF-7 LGR5Δ5	-	1,04	0,44	0,77				
	WNT3A	1,63	1,17	0,96	1,57	0,38	1,25	0,64
	RSPO1	1,29	0,93	0,95	1,24	0,64	1,22	0,65
	WNT3A +RSPO1	<b>5,39</b>	<b>0,84</b>	<b>0,05*</b>	<b>5,16</b>	<b>≤0,001*</b>	0,79	0,49
MCF-7 shKtr	-	1,04	0,42	0,73				
	WNT3A	1,12	0,63	0,82	1,07	0,85		
	RSPO1	0,98	0,43	0,61	0,94	0,85		
	WNT3A +RSPO1	3,19	0,90	0,18	<b>3,06</b>	<b>0,01*</b>		
MCF-7 shRNA1	-	0,72	0,47	0,32				
	WNT3A	0,88	0,29	0,54	1,22	0,58	0,79	0,53
	RSPO1	0,73	0,04	0,51	1,00	0,99	0,74	0,28
	WNT3A +RSPO1	2,40	0,92	0,17	<b>3,31</b>	<b>0,02*</b>	0,75	0,31

**Tabelle 7.7: TopFlash nach Modulation der LGR5-Expression in der Zelllinie HT29.** Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Stimulation zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Stimulation)/*ratio* (Kontrolle)]. Der *fold change* (LGR5-Modulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Reduktion der LGR5-Expression oder Überexpression von LGR5FL bzw. LGR5Δ5 zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Reduktion der LGR5-Expression/LGR5FL bzw. Δ5-Überexpression)/*ratio* (Kontrolle)]. \*p≤0,05

Zelllinie	Stimulation	<i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	Standardabweichung <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	p-Wert <i>ratio</i> [TOPFlash/ FOPFlash]	<i>fold change</i> (Stimulation)	p-Wert <i>fold change</i> (Stimulation)	<i>fold change</i> (LGR5 Modulation)	p-Wert <i>fold change</i> (LGR5 Modulation)
HT29 LVKtr	-	2,62	1,28	0,12				
	WNT3A	2,76	1,87	0,07	1,05	0,89		
	RSPO1	5,40	3,40	0,25	2,06	0,13		
	WNT3A +RSPO1	69,63	41,78	0,07	<b>26,55</b>	<b>0,01*</b>		
HT29 LGR5FL	-	1,21	0,34	0,78				
	WNT3A	3,29	2,13	0,09	2,72	0,10	1,19	0,73
	RSPO1	<b>17,18</b>	<b>9,13</b>	<b>0,04*</b>	<b>14,24</b>	<b>0,02*</b>	3,18	0,06
	WNT3A +RSPO1	<b>29,28</b>	<b>11,60</b>	<b>0,05*</b>	<b>24,27</b>	<b>0,002*</b>	0,42	0,07
HT29 LGR5Δ5	-	2,00	0,74	0,08				
	WNT3A	2,50	1,21	0,13	1,25	0,46	0,90	0,80
	RSPO1	<b>30,91</b>	<b>17,31</b>	<b>0,05*</b>	<b>15,48</b>	<b>0,01*</b>	<b>5,72</b>	<b>0,03*</b>
	WNT3A +RSPO1	<b>35,59</b>	<b>22,84</b>	<b>0,01*</b>	<b>17,83</b>	<b>0,01*</b>	0,51	0,20
HT29 shKtr	-	1,95	0,56	<b>0,01*</b>				
	WNT3A	2,24	1,00	<b>0,05*</b>	1,15	0,62		
	RSPO1	10,08	6,99	<b>0,01*</b>	5,18	0,06		
	WNT3A +RSPO1	34,99	18,72	<b>0,05*</b>	<b>17,96</b>	<b>0,01*</b>		
HT29 shRNA1	-	2,37	0,76	<b>0,01*</b>				
	WNT3A	4,67	4,25	0,18	1,97	0,27	2,08	0,25
	RSPO1	<b>11,76</b>	<b>7,37</b>	<b>0,03*</b>	<b>4,96</b>	<b>0,02*</b>	1,17	0,74
	WNT3A +RSPO1	24,97	22,37	0,07	10,53	0,06	0,71	0,49

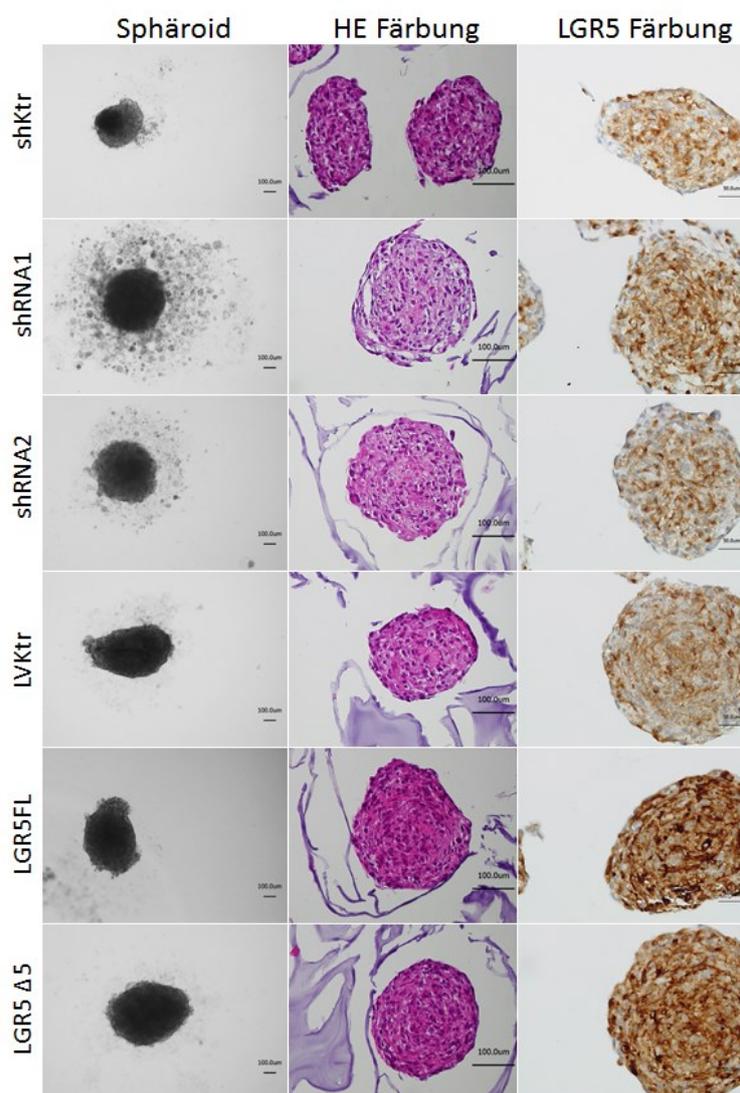
**Tabelle 7.8: TopFlash nach Reduktion der LGR5-Expression in der Zelllinie RD.** Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Stimulation zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Stimulation)/*ratio* (Kontrolle)]. Der *fold change* (LGR5-Modulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Reduktion der LGR5-Expression zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Reduktion der LGR5 Expression)/*ratio* (Kontrolle)]. \*p≤0,05

Zelllinie	Stimulation	<i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	Standardabweichung <i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	p-Wert <i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	<i>fold change</i> (Stimulation)	p-Wert <i>fold change</i> (Stimulation)	<i>fold change</i> (LGR5 Modulation)	p-Wert <i>fold change</i> (LGR5 Modulation)
RD shKtr	-	1,34	0,27	0,69				
	WNT3A	4,15	1,41	0,09	<b>3,10</b>	<b>0,03*</b>		
	RSPO1	0,97	0,36	0,82	0,72	0,23		
	WNT3A +RSPO1	<b>10,55</b>	<b>2,69</b>	<b>0,04*</b>	<b>7,89</b>	<b>0,004*</b>		
RD shRNA1	-	1,11	0,42	0,96			0,83	0,47
	WNT3A	7,07	3,21	0,08	<b>6,37</b>	<b>0,03*</b>	1,71	0,22
	RSPO1	0,96	0,46	0,57	0,86	0,69	0,99	0,97
	WNT3A +RSPO1	<b>17,67</b>	<b>6,65</b>	<b>0,01*</b>	<b>15,92</b>	<b>0,01*</b>	1,68	0,16

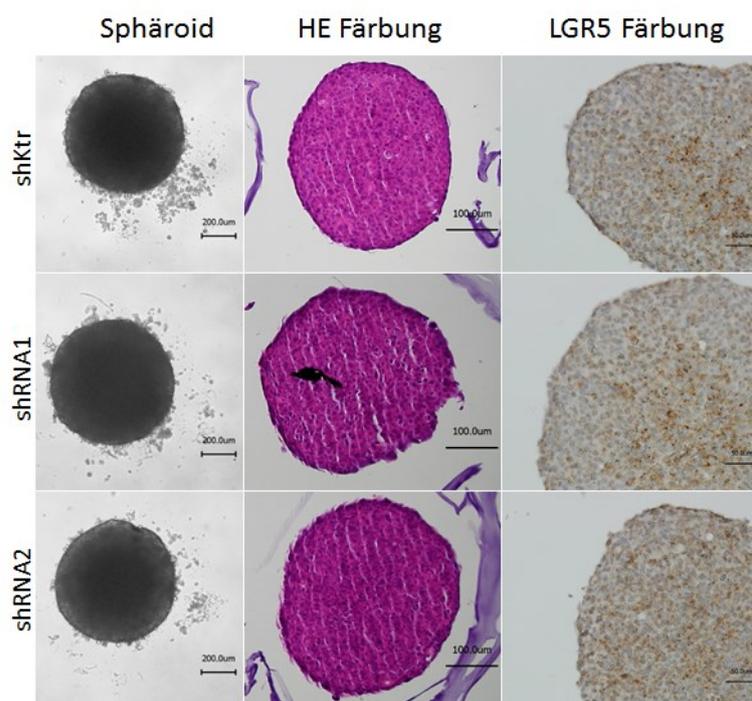
**Tabelle 7.9: TopFlash nach Reduktion der LGR5-Expression in der Zelllinie SKBR3.** Der *fold change* (Stimulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Stimulation zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Stimulation)/*ratio* (Kontrolle)]. Der *fold change* (LGR5-Modulation) ergibt sich aus dem Verhältnis der *ratios* nach Reduktion der LGR5-Expression zu den entsprechenden *ratios* der Kontrollen [*ratio* (Reduktion der LGR5-Expression)/*ratio* (Kontrolle)]. \*p≤0,05

Zelllinie	Stimulation	<i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	Standardabweichung <i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	p-Wert <i>ratio</i> [TOPFlash/FOPFlash]	<i>fold change</i> (Stimulation)	p-Wert <i>fold change</i> (Stimulation)	<i>fold change</i> (LGR5 Modulation)	p-Wert <i>fold change</i> (LGR5 Modulation)
SKBR3 shKtr	-	1,33	0,26	0,74				
	WNT3A	1,25	0,57	0,62	0,94	0,84		
	RSPO1	7,85	0,63	0,06	<b>5,89</b>	<b>≤0,001*</b>		
	WNT3A +RSPO1	<b>34,71</b>	<b>18,22</b>	<b>0,05*</b>	<b>26,05</b>	<b>0,03*</b>		
SKBR3 shRNA1	-	1,29	0,53	0,60			0,97	0,90
	WNT3A	2,37	2,16	0,42	1,84	0,45	1,89	0,43
	RSPO1	8,83	1,19	0,06	<b>6,86</b>	<b>≤0,001</b>	1,13	0,27
	WNT3A +RSPO1	<b>17,18</b>	<b>8,26</b>	<b>0,01*</b>	<b>13,35</b>	<b>0,03*</b>	0,49	0,20

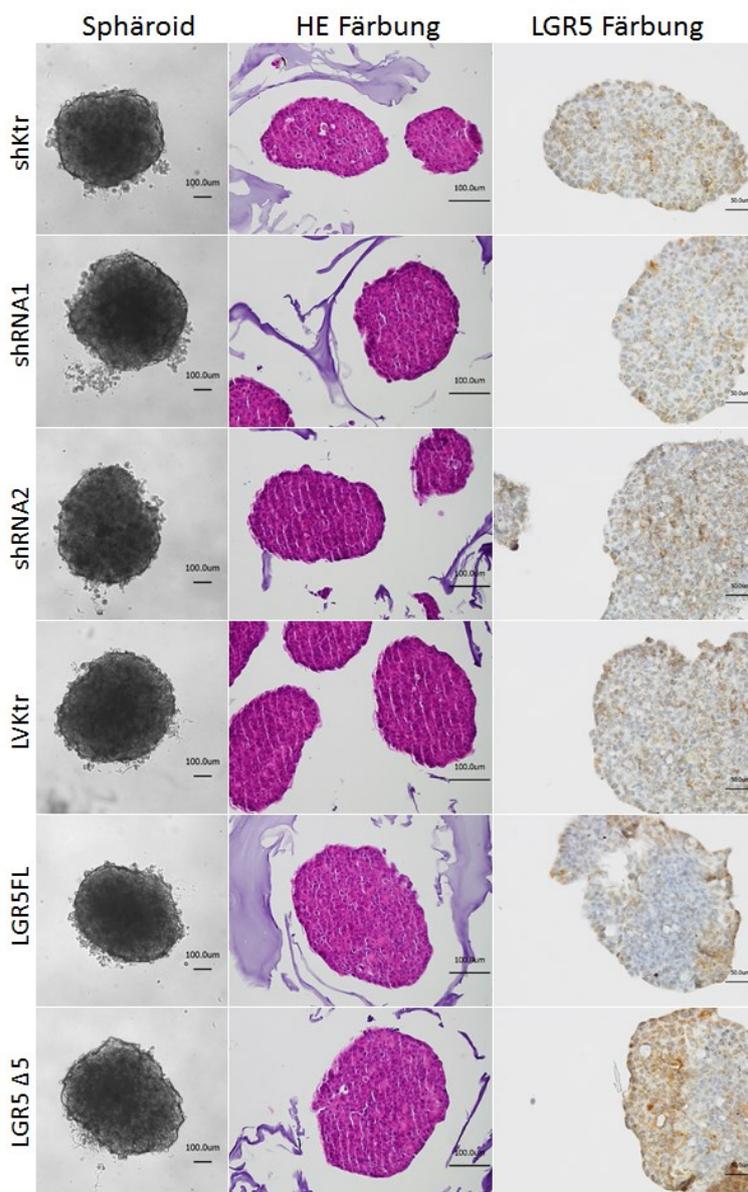
## 7.4 Sphäroide



**Abb. 7.1: 3D-Kultur in der Zelllinie SKLMS-1 nach Modulation der LGR5-Expression.** In der Sphäroid-Spalte ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. einem anti-LGR5-Antikörper gegen Gesamt-LGR5 gerichtet (LGR5-Färbung) behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion LGR5-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Behandlung mit dem LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmid. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100µm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50µm.

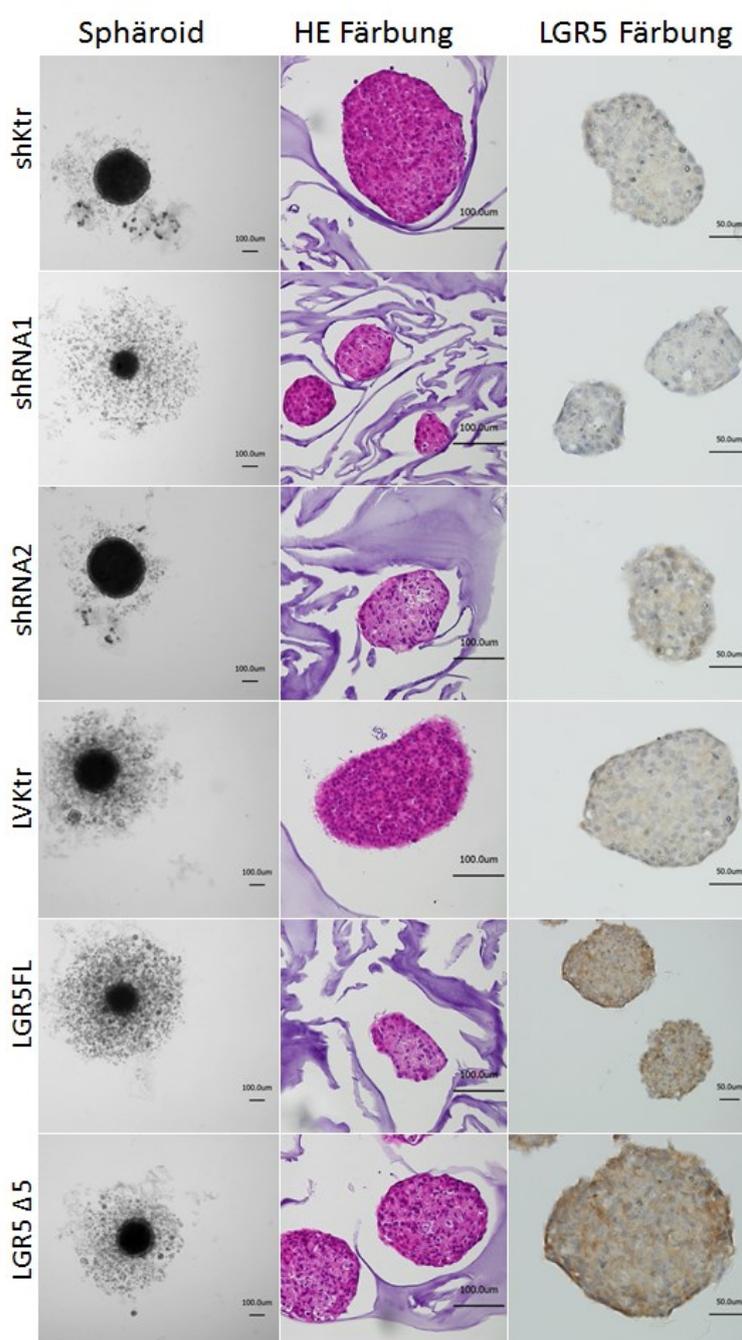


**Abb. 7.2: 3D-Kultur in der Zelllinie SKBR3 nach Reduktion der LGR5-Expression.** In der Sphäroid-Spalte ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. einem anti-LGR5-Antikörper gegen Gesamt-LGR5 gerichtet (LGR5-Färbung) behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion LGR5-Expression. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100µm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50µm.



**Abb. 7.3: 3D-Kultur in der Zelllinie HT29 nach Modulation der LGR5-Expression.**

In der Sphäroid-Spalte ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. einem anti-LGR5-Antikörper gegen Gesamt-LGR5 gerichtet (LGR5-Färbung) behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA-Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Behandlung mit dem LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmid. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100µm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50µm.



**Abb. 7.4: 3D-Kultur in der Zelllinie HaCaT nach Modulation der LGR5-Expression.** In der Sphäroid-Spalte ist das Durchlichtbild der Sphäroide nach sieben Tagen Kultivierung dargestellt. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert und in Paraffinblöcken als TMA (*tissue microarray*) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) bzw. einem anti-LGR5-Antikörper gegen Gesamt-LGR5 gerichtet (LGR5-Färbung) behandelt. shKtr bezeichnet die *non target*-shRNA Kontrolle, shRNA1 und shRNA2 die beiden eingesetzten shRNAs zur Reduktion *LGR5*-Expression. LGR5FL bzw. LGR5Δ5 bezeichnet die Behandlung mit dem LGR5FL- bzw. LGR5Δ5-Expressionsplasmid. LVKtr bezeichnet die entsprechende Leervektorkontrolle. Die Markierung links unten im Bild in den Spalten *Sphäroid* und *HE-Färbung* entspricht 100µm und in der Spalte *LGR5 Färbung* 50µm.

## 7.5 mRNA-Gehalt ausgewählter Gene nach Modulation der LGR5-Expression

**Tabelle 7.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie RD.** Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt. (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene SOX2 und TCF7 konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

		PDGFB	CDKN2B	OCT3/4	NANOG	MIMP7	MDM2	DKK1	MYC	CAECAM1	CDKN1A	CCND1	ALDH1A2	
RD	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	335,6	86,6	157,4	64,5	117,7	98,0	97,8	364,5	87,8	110,9	190,7	94,0
		p-Wert	0,07	0,42	0,08	0,30	0,03	0,89	0,90	0,40	0,34	0,29	0,06	0,68
	shRNA2	relative mRNA Expression (%)	288,7	66,4	114,2	58,7	120,6	188,9	117,1	8,6	131,6	126,4	147,9	39,2
		p-Wert	0,09	0,28	0,66	0,01	0,03	0,17	0,42	0,52	0,31	0,45	0,11	0,16
			PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFE3	TGFβ	TWIST1	VIM	
	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	44,6	143,0	143,2	56,8			60,1	502,6	125,3	231,7	77,0	
		p-Wert	0,02	0,65	0,15	0,64			0,02	0,08	0,29	0,02	0,52	
	shRNA2	relative mRNA Expression (%)	105,1	634,6	118,3	169,2			111,7	261,9	112,7	338,4	116,4	
		p-Wert	0,72	0,50	0,45	0,68			0,45	0,12	0,42	0,01	0,25	

**Tabelle 7.11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie HT29. Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt: (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene SOX2, TCF7 (nach Reduktion der LGR5-Expression) und MMP7 (nach LGR5FL bzw. LGR5Δ5-Überexpression) konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.**

		ALDH1A2	CCND1	CDKN1A	CAECAM1	MYC	DKK1	MDM2	MMP7	NANOG	OCT3/4	CDKN2B	PDGFB	
		PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFE3	TGFβ	TWIST1	VIM		
HT29	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	124,9	104,2	102,8	77,5	222,8	140,1	107,1	106,9	637,2	203,1	132,2	100,8
		p-Wert	0,57	0,88	0,71	0,19	0,11	0,34	0,80	0,93	0,29	0,13	0,45	0,97
	shRNA2	relative mRNA Expression (%)	106,7	122,8	111,6	89,4	239,6	118,3	118,7	108,8	268,3	151,3	124,1	110,2
		p-Wert	0,70	0,57	0,61	0,65	0,20	0,51	0,50	0,90	0,13	0,20	0,47	0,80
	LVKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0
	LGR5FL	relative mRNA Expression (%)	150,3	115,9	94,0	90,2	85,4	141,5	119,0		64,8	134,2	93,8	116,4
		p-Wert	0,27	0,06	0,42	0,52	0,28	0,25	0,56		0,29	0,57	0,19	0,42
	LGR5Δ5	relative mRNA Expression (%)		130,0	102,7	110,3	71,3	97,0	108,6		79,2	3975,	97,4	107,5
		p-Wert		0,27	0,42	0,44	0,09	0,17	0,84		0,28	0,51	0,42	0,46
	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	51,8	85,89	294,5	76,0			69,1	79,2	92,8	1591	0,92	
p-Wert		0,07	0,74	0,03	0,47			0,28	0,57	0,73	0,12	≤0,001		
shRNA2	relative mRNA Expression (%)	93,1	289,8	219,0	128,5			89,2	143,1	95,1	334,2	1,91		
	p-Wert	0,72	0,24	0,08	0,29			0,69	0,32	0,85	0,33	≤0,001		
LVKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
LGR5FL	relative mRNA Expression (%)	90,2		110,4	79,64	1265,	98,0	109,8	82,9	98,7	198,2	759,7		
	p-Wert	0,52		0,27	0,68	0,52	0,90	0,07	0,19	0,94	0,57	0,02		
LGR5Δ5	relative mRNA Expression (%)	110,3	168,8	98,7	117,6	146,5	105,2	93,9	106,7	103,2	98,0	35,7		
	p-Wert	0,44	0,40	0,94	0,37	0,50	0,77	0,51	0,58	0,78	0,98	0,09		

**Tabelle 7.12: Zusammenfassung der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie SKLMS-1.** Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt. (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene *SOX2*, *TCF7* (nach Reduktion der *LGR5*-Expression) und *MMP7* (nach *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression) konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

		ALDH1A2	CCND1	CDKN1A	CAECAM1	MYC	DKK1	MDM2	MMP7	NANOG	OCT3/4	CDKN2B	PDGFB
		<b>shKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>shRNA1</b>	relative mRNA Expression (%)	168,9	92,4	78,7	228,2	114,1	72,5	108,0	37,2	255,2	58,6	96,4	58,7
	p-Wert	0,29	0,55	0,10	0,20	0,42	0,03	0,25	0,20	0,46	0,04	0,87	0,13
<b>shRNA2</b>	relative mRNA Expression (%)	134,5	101,5	70,3	340,1	128,5	112,0	109,8	59,0	127,5	69,2	125,2	94,2
	p-Wert	0,24	0,89	0,06	0,01	0,06	0,20	0,41	0,03	0,02	0,01	0,42	0,52
<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0
<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression (%)	106,8	79,3	85,0	76,4	96,3	76,7	111,2		219,5	68,5	83,3	113,7
	p-Wert	0,82	0,29	0,22	0,11	0,67	0,34	0,62		0,22	0,45	0,35	0,45
<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)		62,6	73,0	66,6	85,2	85,2	102,0		115,6	27,8	127,1	105,8
	p-Wert		0,05	0,15	0,08	0,01	0,68	0,91		0,42	0,09	0,55	0,53
		PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFE3	TGFβ	TWIST1	VIM	
<b>shKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
<b>shRNA1</b>	relative mRNA Expression (%)	45,0	115,4	188,7	232,3			44,4	18,7	82,3	88,7	84,1	
	p-Wert	0,04	0,82	0,002	0,52			0,01	0,03	0,35	0,65	0,41	
<b>shRNA2</b>	relative mRNA Expression (%)	146,9	92,6	267,9	41,2			97,4	73,7	95,4	100,9	43,2	
	p-Wert	0,08	0,95	0,01	0,44			0,71	0,18	0,53	0,95	0,11	
<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression (%)	76,4	20,6	71,6	128,4	159,8	80,5	106,7	48,7	93,6	111,5	165,8	
	p-Wert	0,11	0,46	0,24	0,57	0,27	0,21	0,67	0,23	0,44	0,53	0,42	
<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)	66,6	72,0	73,3	113,7	116,7	86,8	84,2	71,4	83,1	99,0	93,0	
	p-Wert	0,08	0,61	0,19	0,83	0,50	0,30	0,20	0,40	0,02	0,90	0,84	

SKLMS-1

**Tabelle 7.13: Zusammenfassung der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie HaCaT.** Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt. (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene *SOX2*, *TCF7* (nach Reduktion der *LGR5*-Expression) und *MMP7* (nach *LGR5FL* bzw. *LGR5Δ5*-Überexpression) konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden. Der mRNA-Gehalt von *TFE3* lag unter der Nachweisgrenze.

		<b>ALDH1A2</b>	<b>CCND1</b>	<b>CDKN1A</b>	<b>CAECAM1</b>	<b>MYC</b>	<b>DKK1</b>	<b>MDM2</b>	<b>MMP7</b>	<b>NANOG</b>	<b>OCT3/4</b>	<b>CDKN2B</b>	<b>PDGFB</b>	
HaCaT	<b>shKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,	100,0	100,0	
	<b>shRNA1</b>	relative mRNA Expression (%)	123,3	95,2	133,5	8,61	82,5	65,7	93,3	89,9	103,2	90,9	165,4	88,5
		p-Wert	0,48	0,59	0,10	0,39	0,18	0,04	0,01	0,89	0,83	0,71	0,20	0,22
	<b>shRNA2</b>	relative mRNA Expression (%)	151,2	98,1	95,8	6,59	79,1	75,4	95,2	245,1	173,0	136,	168,6	65,7
		p-Wert	0,30	0,92	0,70	0,50	0,25	0,04	0,19	0,22	0,27	0,29	0,16	0,02
	<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,	100,0	100,0
	<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression (%)	179,0	142,4	146,6	190,2	145,1	141,6	148,6		199,5	177,	202,5	150,0
		p-Wert	0,11	0,19	≤0,001	0,10	0,08	0,03	0,05		0,23	0,45	0,02	0,14
	<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)	171,4	116,7	133,7	136,8	123,8	126,3	141,3		137,2	100,	133,8	138,8
		p-Wert	0,12	0,20	0,12	0,22	0,13	0,60	0,04		0,25	0,64	0,30	0,09
			<b>PIR</b>	<b>RNF43</b>	<b>SERPINE2</b>	<b>SNAI2</b>	<b>SOX2</b>	<b>TCF7</b>	<b>TERF2IP</b>	<b>TFE3</b>	<b>TGFβ</b>	<b>TWIST1</b>	<b>VIM</b>	
	<b>shKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0		100,0	100,		
<b>shRNA1</b>	relative mRNA Expression (%)	63,9	74,7	68,0	251,6			57,3		99,8	212,			
	p-Wert	≤0,001	0,72	0,16	0,12			0,02		0,97	0,10			
<b>shRNA2</b>	relative mRNA Expression (%)	100,8	173,3	60,9	236,8			81,7		85,9	144,			
	p-Wert	0,97	0,68	0,20	0,10			0,20		0,22	0,27			
<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,			
<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression in	190,2	55,5	96,3	48,4	33,1	57,14	156,1		135,3	152,			
	p-Wert	0,10	0,04	0,79	0,24	0,04	0,05	0,06		0,03	0,12			
<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)	136,8	70,7	104,9	43,9	90,5	100,5	135,2		135,1	161,			
	p-Wert	0,22	0,18	0,62	≤0,001	0,13	0,98	0,05		0,04	0,03			

**Tabelle 7.14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie SKBR3. Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt. (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene SOX2 und TCF7 konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.**

		SKBR3																							
		ALDH1A2	CCND1	CDKN1A	CAECAM1	MYC	DKK1	MDM2	MMP7	NANOG	OCT3/4	CDKN2B	PDGFB	PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFE3	TGFβ	TWIST1	VIM	
<b>shKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	p-Wert	0,76	0,46	0,86	0,06	0,82	0,01	0,27	0,63	0,69	0,85	0,60	0,74						0,01	0,22	0,06	0,94	0,79		
<b>shRNA1</b>	relative mRNA Expression (%)	103,5	108,5	99,2	52,9	103,4	181,5	110,6	83,6	119,5	89,6	113,9	103,5	64,7	94,2	240,7	106,0			55,1	70,4	60,2	105,6	131,5	
	p-Wert	0,30	0,22	0,14	0,01	0,33	0,07	0,81	0,73	0,47	0,05	0,60	0,95	0,004	0,89	0,05	0,88			0,01	0,02	0,06	0,94	0,79	
<b>shRNA2</b>	relative mRNA Expression (%)	85,2	118,7	71,3	70,8	121,2	82,9	103,0	110,7	74,1	159,3	94,6	99,3	180,7	202,2	103,1	178,8			97,9	177,6	50,8	157,5	90,4	
	p-Wert	0,41	0,09	0,80	0,34					0,78	0,04	0,03	0,17	0,41	0,09	0,80	0,34			0,78	0,04	0,03	0,17	0,50	

**Tabelle 7.15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Traqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie SF767.** Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt: (n=3). Der mRNA-Gehalt von MMP7 konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

		ALDH1A2	CCND1	CDKN1A	CAECAM1	MYC	DKK1	MDM2	MMP7	NANOG	OCT3/4	CDKN2B	PDGFB	
SF676	<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 0		100,0 0	100,0	100,0 0	100,0	
	<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression (%)	104,7	102,5	128,0	90,3	107,2	96,05	86,4		84,6	101,3	96,0	94,1
		p-Wert	0,73	0,83	0,42	0,78	0,75	0,67	0,42		0,56	0,94	0,79	0,59
	<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)	90,8	96,1	95,1	74,7	84,7	100,9	88,1		81,1	60,1	96,7	86,0
		p-Wert	0,37	0,74	0,76	0,13	0,19	0,84	0,05		0,35	0,51	0,42	0,43
			PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFF3	TGFβ	TWIST1	VIM	
	<b>LVKtr</b>	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	<b>LGR5FL</b>	relative mRNA Expression (%)	90,3	80,7	100,0	59,3	81,3	83,9	105,8 4	125,3	119,8	88,3	5,5	
		p-Wert	0,78	0,20	1,00	0,17	0,33	0,13	0,71	0,42	0,14	0,18	0,23	
	<b>LGR5Δ5</b>	relative mRNA Expression (%)	74,7	76,76	93,1	85,1	88,4	87,5	84,98	141,4	87,2	85,0	1368	
		p-Wert	0,13	0,11	0,24	0,10	0,43	0,67	0,03	0,21	0,08	0,09	0,44	

**Tabelle 7.16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Taqman-qPCR verschiedener Gene in der Zelllinie MCF-7.**  
 Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt (n=3). Der mRNA-Gehalt der Gene SOX2, TCF7 (nach Reduktion der LGR5-Expression) und MMP7 konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden.

		ALDH1A2	CCND1	CDKN1A	CAECAM1	MYC	DKK1	MDM2	MMP7	NANOG	OCT3/4	CDKN2B	PDGFB	
MCF7	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	108,2	122,7	115,2	93,1	126,9	139,4	114,0		121,1	125,3	263,4	78,5
		p-Wert	0,78	0,44	0,27	0,72	0,32	0,30	0,48		0,43	0,64	0,09	0,28
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	96,7	106,9	97,85	107,2	96,0	115,3	107,6		359,4	276,8	94,2	108,6
		p-Wert	0,91	0,88	0,92	0,89	0,86	0,73	0,85		0,34	0,25	0,89	0,85
	LVKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0
	LGR5FL	relative mRNA Expression (%)	90,6	101,9	108,0	135,6	70,4	82,5	101,0		71,1	181,9	78,5	96,6
		p-Wert	0,69	0,42	0,63	0,12	0,14	0,19	0,92		0,63	0,65	0,26	0,64
	LGR5Δ5	relative mRNA Expression (%)	549,1	98,8	97,7	146,7	76,4	92,5	107,1		123,8	76,8	70,4	83,3
		p-Wert	0,24	0,93	0,85	0,26	0,32	0,65	0,24		0,50	0,68	0,32	0,38
			PIR	RNF43	SERPINE2	SNAI2	SOX2	TCF7	TERF2IP	TFF3	TGFβ	TWIST1	VIM	
	shKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
	shRNA1	relative mRNA Expression (%)	80,9	38,0	273,6	64,2			64,8	88,9	235,5	284,1	102,4	
		p-Wert	0,01	0,57	0,02	0,46			0,22	0,58	0,08	0,32	0,92	
shRNA2	relative mRNA Expression (%)	110,9	68,42	110,9	56,2			97,6	122,1	116,6	371,8	142,0		
	p-Wert	0,59	0,71	0,62	0,56			0,94	0,55	0,66	0,24	0,40		
LVKtr	relative mRNA Expression (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
LGR5FL	relative mRNA Expression (%)	135,6	88,4	65,6	84,7	97,4	109,5	95,4	95,4	76,7	50,2	94,4		
	p-Wert	0,12	0,45	0,03	0,63	0,86	0,73	0,19	0,19	0,08	0,03	0,95		
LGR5Δ5	relative mRNA Expression (%)	146,7	104,3	82,9	100,4	102,0	228,6	98,1	88,6	75,7	2524	387,4		
	p-Wert	0,26	0,88	0,39	0,99	0,97	0,47	0,78	0,42	0,02	0,39	0,24		

## 7.6 Überleben und Klinische Daten

**Tabelle 7.17: Überleben und klinische Daten der Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom.** Es sind das Überleben und tumorassoziierte Parameter von Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom entsprechend des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* dargestellt. Die Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen erfolgte entsprechend des Medians des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5*. Die Normalisierung des *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts erfolgte zum *RPII* (RNA-Polymerase II) mRNA-Gehalt. Multivariate Cox-Regressionsanalyse: adjustiert nach Tumorgrad, T-Status (Tumorgröße), N-Status (Lymphknotenmetastasen) und Geschlecht. No: keine Lymphknotenmetastasen; N1: Lymphknotenmetastasen; M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen; MX: nicht bekannt; RR: relatives Risiko; \*  $p \leq 0,05$  und vs. Referenzgruppe; KI: Konfidenzintervall.

Kategorie	Patienten	<i>LGR5FL</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>RPII</i>		<i>LGRΔ5</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>RPII</i>	
		$\leq 8,7 \cdot 10^{-6}$	$> 8,7 \cdot 10^{-6}$	$\leq 10,2 \cdot 10^{-6}$	$> 10,2 \cdot 10^{-6}$
<b>Gesamt</b>	69	35	34	35	34
<b>Geschlecht</b>		p=0,256		p=0,591	
Männer	55	26	29	27	28
Frauen	14	9	5	8	6
<b>Tumorgrad</b>		p=0,246		p=0,114	
I	8	6	2	6	2
II	50	25	25	26	24
III	11	4	7	3	8
<b>Patientenüberleben</b>					
ja	26	15	11	18	8
nein	43	20	23	17	26
<b>Lymphknoten-metastasen</b>		p=0,387		p=0,02*	
N0	30	17	13	20	10
N1	39	18	21	15	24
<b>Fernmetastasen</b>		p=0,55		p=0,243	
M0	43	21	20	20	23
M1	4	1	3	1	3
MX	22	11	11	14	8
<b>Tumorstadium</b>		p=0,871		p=0,145	
I	11	6	5	9	1
II	20	11	9	10	10
III	7	4	3	3	4
IV	31	14	17	13	18
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>		p=0,24		p=0,001*	
medianes Überleben(Mon.)		23,7	19,9	26,9	16,9
95 % KI		28,1-19,2	24,3-15,5	31,1-22,7	21,0-12,9
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>		p=0,20		p=0,001*	
medianes, rezidivfreies Überleben(Mon.)		26,7	22,3	34,3	14,9
95 % KI		33,1-20,3	29,2-15,5	41,4-27,3	19,2-10,6
<b>Univariate Cox's Regression</b>		p=0,251		p=0,002*	
RR (relatives Risiko)		1,4		2,8	
95 % KI		0,77-2,73		1,45-5,58	
<b>Multivariate Cox's-Regression</b>		p=0,13		p=0,006*	

Kategorie	Patienten	LGR5FL mRNA-Gehalt in zmol/Kopie RPII		LGRΔ5 mRNA-Gehalt in zmol/Kopie RPII	
		≤8,7*10 <sup>-6</sup>	>8,7*10 <sup>-6</sup>	≤10,2*10 <sup>-6</sup>	>10,2*10 <sup>-6</sup>
RR (relatives Risiko)		1,6		2,7	
95 % KI		0,84-3,3		1,33-5,78	

**Tabelle 7.18: Überleben und klinische Daten der Weichteilsarkompatienten.** Es ist das Überleben von WTS-Patienten entsprechend des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5* dargestellt. Die Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen erfolgte entsprechend des Medians des mRNA-Gehalts von *LGR5FL* und *LGR5Δ5*. Die Normalisierung des *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT*-mRNA-Gehalt (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase). Multivariate Cox-Regressionsanalyse: adjustiert nach Tumorstadium, histologischem Subtyp, Tumorresektion und Tumorlokalisation. M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen; RR: relatives Risiko; \* p≤0,05 und vs. Referenzgruppe. Ø Durchschnitt; KI: Konfidenzintervall.

Kategorie	Patienten	LGR5FL mRNA-Gehalt in zmol/Kopie HPRT		LGRΔ5 mRNA-Gehalt in zmol/Kopie HPRT	
		≤1,07*10 <sup>-5</sup>	>1,07*10 <sup>-5</sup>	≤7,6*10 <sup>-6</sup>	>7,6*10 <sup>-6</sup>
<b>Gesamt</b>	77	39	38	39	38
<b>Geschlecht</b>		p=0,429		p=0,212	
Männer	35	16	19	15	20
Frauen	42	23	19	24	18
<b>Tumorgrad</b>		p=0,023*		p=0,005*	
I	10	1	9	0	10
II	33	21	12	21	12
III	26	12	14	13	13
IV	8	5	3	5	3
<b>Tumorart</b>		p=0,194		p=0,166	
Liposarkom	19	6	13	5	14
Fibrosarkom/malignes fibröses histiozytom	20	9	11	11	9
neurogenes Sarkom	6	3	3	3	3
Rhabdomyosarkom/Leiomyosarkom	22	15	7	14	8
andere WTS	10	6	4	6	4
<b>Tumorresektion</b>		p=0,377		p=0,172	
radikal (R0)	51	24	27	23	28
nicht radikal (R1)	26	15	11	16	10
<b>Patientenüberleben</b>					
ja	36	15	21	13	23
nein	41	24	17	26	15
<b>Lokalisation</b>		p=0,444		p=0,207	
Extremitäten	49	25	24	26	23
Thorax	6	2	4	1	5
Kopf	1	0	1	0	1
Abdomen	19	10	9	10	9
multiple	2	2	0	2	0
<b>Metastasen</b>		p=0,291		p=0,025*	
M0	21	9	12	7	14
M1	29	17	12	19	10
<b>Diagnosealter</b>		p=0,218		p=0,039*	
Alter (Ø)		59,9	55,4	61,4	53,9

Kategorie	Patienten	<i>LGR5FL</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>HPRT</i>		<i>LGR5Δ5</i> mRNA-Gehalt in zmol/Kopie <i>HPRT</i>	
		≤1,07*10 <sup>-5</sup>	>1,07*10 <sup>-5</sup>	≤7,6*10 <sup>-6</sup>	>7,6*10 <sup>-6</sup>
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>		p=0,056		p=0,004*	
medianes Überleben(mon.)		50,1	80,3	45,8	86,2
95 % KI		37,2-62,9	59,4-101,3	33,3-58,4	64,7-107,6
<b>Kaplan-Meier Analyse</b>		p=0,196		p=0,043*	
mediane, rezidivfreies Überleben(Mon.)		44,4	55,3	40,2	58,6
95 % KI		31-55,7	42,9-67,7	27,6-52,6	46,7-70,5
<b>Univariate Cox's Regression</b>		p=0,06		p=0,006*	
RR		1,8		2,5	
95 % KI		0,97-3,5		1,3-4,8	
<b>Multivariate Cox's-Regression</b>		p=0,12		p=0,026*	
RR		1,8		2,6	
95 % KI		0,9-4,0		1,1-6,0	

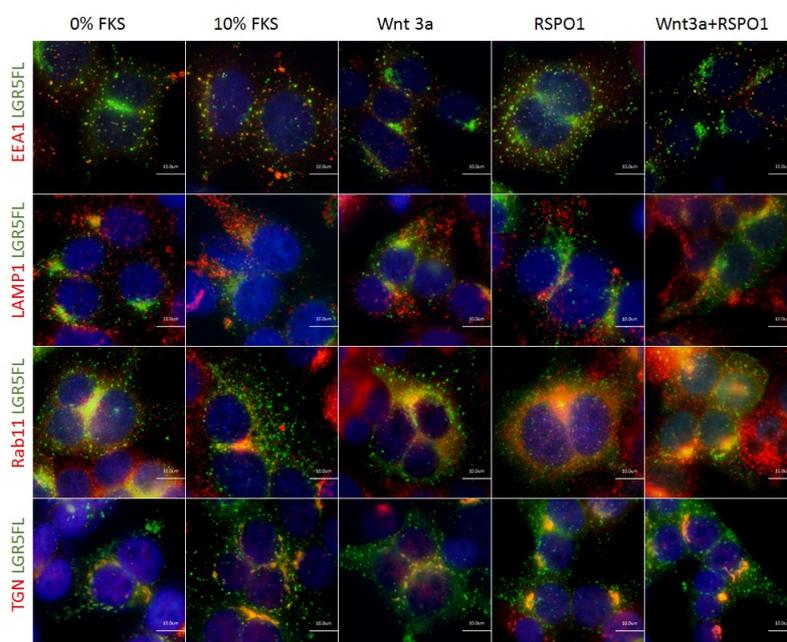
Tabelle 7.19: Bivariate Korrelation nach Spearman des *LGR5FL*- und *LGR5Δ5*-mRNA-Gehalts sowie des mRNA-Verhältnisses (*LGR5FL/LGR5Δ5*) der beiden Varianten mit dem mRNA-Gehalt verschiedener Tumormarker in Proben der oralen Plattenepithelkarzinome. K.Koeffizient: Rangkorrelationskoeffizient; N: Anzahl der Fälle; \*p≤0,05; \*\*p≤0,001.

Spearman-Rho		<i>LGR5FL</i> /RPII	<i>LGR5Δ5</i> /RPII	<i>LGR5FL</i> / <i>LGR5Δ5</i>
Survivin	K.Koeffizient	-0,034	0,054	<b>-0,424**</b>
	p (2-seitig)	0,783	0,657	<b>≤0,001</b>
	N	69	69	<b>69</b>
HER2	K.Koeffizient	-0,146	-0,189	<b>0,296*</b>
	p (2-seitig)	0,231	0,120	<b>0,014</b>
	N	69	69	<b>69</b>
EGFR	K.Koeffizient	-0,081	-0,116	<b>0,239*</b>
	p (2-seitig)	0,510	0,341	<b>0,048</b>
	N	69	69	<b>69</b>
CCND1	K.Koeffizient	<b>0,239*</b>	<b>0,408**</b>	-0,147
	p (2-seitig)	<b>0,048</b>	<b>0,001</b>	0,227
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
OPNa	K.Koeffizient	<b>0,239*</b>	0,216	-0,015
	p (2-seitig)	<b>0,048</b>	0,075	0,903
	N	<b>69</b>	69	69
OPNb	K.Koeffizient	<b>0,275*</b>	0,236	-0,004
	p (2-seitig)	<b>0,022</b>	0,051	0,971
	N	<b>69</b>	69	69
OPNc	K.Koeffizient	<b>0,243*</b>	0,213	0,010
	p (2-seitig)	<b>0,045</b>	0,079	0,932
	N	<b>69</b>	69	69
CA9	K.Koeffizient	0,220	0,195	<b>0,238*</b>
	p (2-seitig)	0,069	0,108	<b>0,049</b>
	N	69	69	<b>69</b>
VEGFa	K.Koeffizient	0,026	-0,093	<b>0,254*</b>

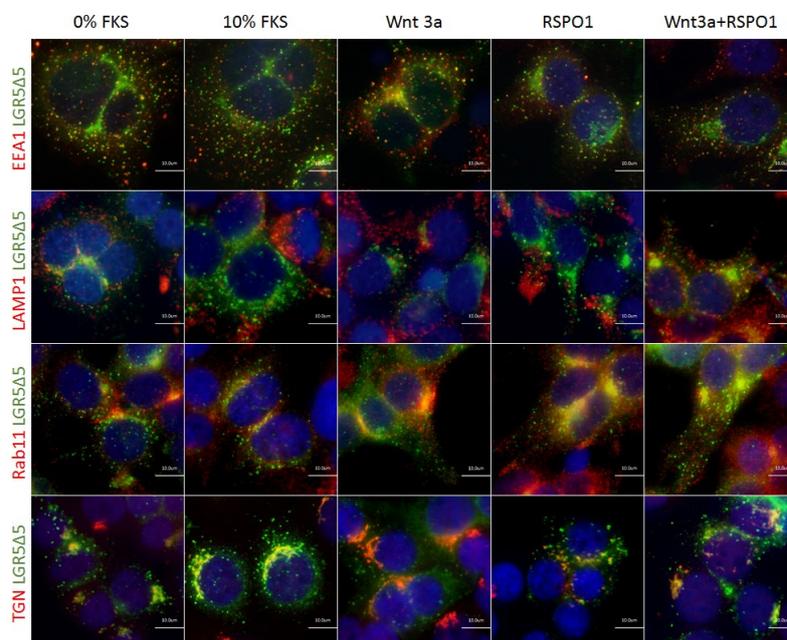
Spearman-Rho		LGR5FL/RPII	LGR5Δ5/RPII	LGR5FL/LGR5Δ5
	p (2-seitig)	0,829	0,445	<b>0,035</b>
	N	69	69	<b>69</b>
CA2	K.Koeffizient	<b>0,266*</b>	0,183	-0,045
	p (2-seitig)	<b>0,027</b>	0,133	0,715
	N	<b>69</b>	69	69
MMP7	K.Koeffizient	<b>0,409**</b>	<b>0,342*</b>	-0,013
	p (2-seitig)	<b>≤0,001</b>	<b>0,004</b>	0,917
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
TCF7	K.Koeffizient	<b>0,539**</b>	<b>0,520**</b>	-0,148
	p (2-seitig)	<b>≤0,001</b>	<b>≤0,001</b>	0,224
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
CYP1B1	K.Koeffizient	<b>0,348**</b>	<b>0,391**</b>	-0,026
	p (2-seitig)	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,830
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
hCCL8	K.Koeffizient	0,059	0,198	<b>-0,391**</b>
	p (2-seitig)	0,631	0,104	<b>0,001</b>
	N	69	69	<b>69</b>
TWIST	K.Koeffizient	<b>0,375**</b>	<b>0,284*</b>	0,204
	p (2-seitig)	<b>0,001</b>	<b>0,018</b>	0,093
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
NANOG	K.Koeffizient	<b>0,246*</b>	0,049	0,215
	p (2-seitig)	<b>0,041</b>	0,689	0,076
	N	<b>69</b>	69	69
CDH1	K.Koeffizient	-0,068	-0,227	<b>0,282*</b>
	p (2-seitig)	0,580	0,061	<b>0,019</b>
	N	69	69	<b>69</b>
VIM	K.Koeffizient	<b>0,484**</b>	<b>0,465**</b>	-0,130
	p (2-seitig)	<b>≤0,001</b>	<b>≤0,001</b>	0,286
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	69
OCT3/4	K.Koeffizient	<b>0,245*</b>	0,156	-0,041
	p (2-seitig)	<b>0,042</b>	0,202	0,735
	N	<b>69</b>	69	69
RNF43	K.Koeffizient	0,062	-0,105	<b>0,288*</b>
	p (2-seitig)	0,613	0,391	<b>0,017</b>
	N	69	69	<b>69</b>
SNAI1	K.Koeffizient	<b>0,266*</b>	<b>0,300*</b>	<b>-0,244*</b>
	p (2-seitig)	<b>0,027</b>	<b>0,012</b>	<b>0,043</b>
	N	<b>69</b>	<b>69</b>	<b>69</b>
CD44	K.Koeffizient	0,141	-0,030	<b>0,396**</b>
	p (2-seitig)	0,256	0,810	<b>0,001</b>
	N	67	67	<b>67</b>
SOX2	K.Koeffizient	-0,031	-0,151	<b>0,249*</b>
	p (2-seitig)	0,803	0,219	<b>0,040</b>

Spearman-Rho		LGR5FL/RPII	LGR5Δ5/RPII	LGR5FL/LGR5Δ5
	N	68	68	68

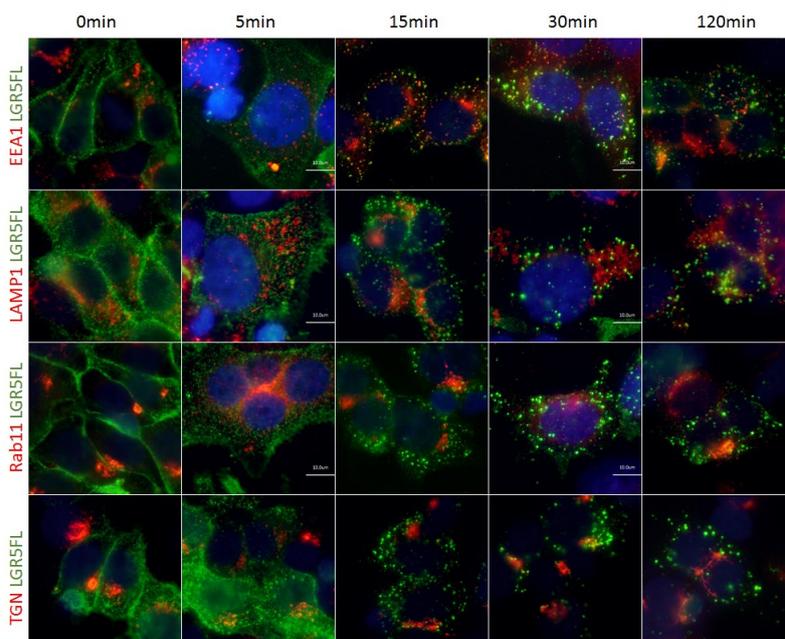
## 7.7 LGR5 Endozytose



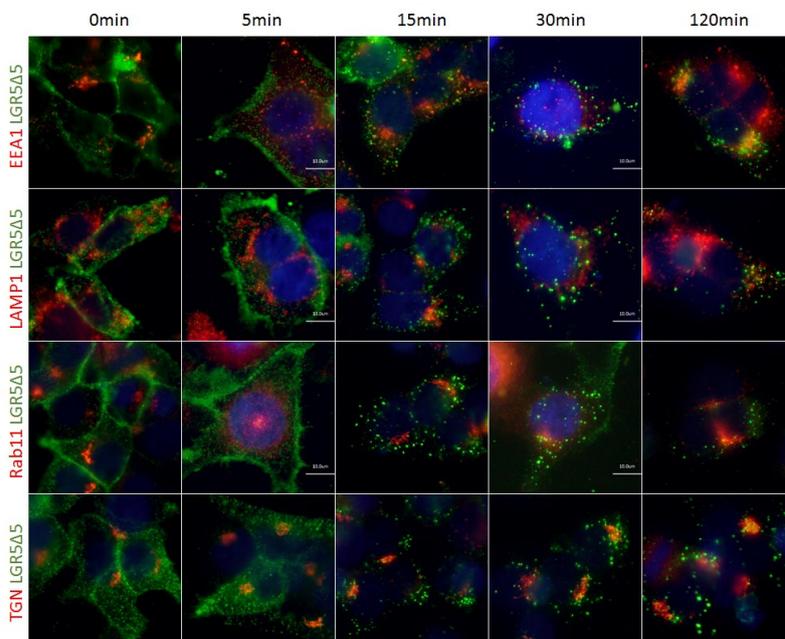
**Abb. 7.5: Internalisierung von überexprimiertem *LGR5FL* in HEK293T-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulanz.** Die Zellen wurden für 16 Stunden im RPMI-Medium mit Zusatz von 0,1 % (0% FKS) Serum, 10 % Serum, 150ng/ml WNT3A, RSPO1 oder WNT3A in Kombination mit RSPO1 kultiviert und fixiert. Dargestellt ist die Doppelfärbung mit dem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper (grün) und Antikörpern gegen die Marker des Endozytoseapparats (rot) EEA1:frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN46: trans-Golgi. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.



**Abb. 7.6: Internalisierung von überexprimiertem *LGR5Δ5* in HEK293T-Zellen in Abhängigkeit vom Stimulanz.** Die Zellen wurden für 16 h im RPMI Medium mit Zusatz von 0,1 % (0% FKS) Serum, 10 % Serum, 150ng/ml WNT3A, RSPO1 oder WNT3A in Kombination mit RSPO1 kultiviert und fixiert. Dargestellt ist die Doppelfärbung mit dem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper (grün) und Antikörpern gegen die Marker des Endozytoseapparats (rot) EEA1:frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN46: trans-Golgi. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.



**Abb. 7.7: Zeitlich abhängige Internalisierung von überexprimiertem LGR5FL in HEK293T-Zellen.** Die Zellen wurden mit dem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper (LGR5/grün) bei 4°C behandelt und anschließend sofort fixiert (4°C) oder für 5, 15, 30 oder 120 Minuten bei 37°C im Vollmedium inkubiert, bevor sie fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen die Marker des Endozytoseapparats (rot) behandelt wurden. EEA1: frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN46: trans-Golgi. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.



**Abb. 7.8: Zeitlich abhängige Internalisierung von überexprimiertem LGR5Δ5 in HEK293T Zellen.** Die Zellen wurden mit dem FITC-gekoppelten anti-Myc-Tag-Antikörper (LGR5/grün) bei 4°C behandelt und anschließend sofort fixiert (4°C) oder für 5, 15, 30 oder 120 Minuten bei 37°C im Vollmedium inkubiert, bevor sie fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen die Marker des Endozytoseapparats (rot) behandelt wurden. EEA1: frühe Endosome; LAMP1: Lysosome; Rab11: Recyclingendosome; TGN46: trans-Golgi. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Lösung.

## 7.8 Endogene Expression Wnt-Signalweg relevanter Gene in Tumorzelllinien

Tabelle 7.20: Endogener mRNA-Gehalt der in den LGR5-RNF43-RSPO-Signalweg eingebundenen Proteine. Es ist der relative mRNA-Gehalt in % dargestellt. (n=3).

		LGR4	LGR5	LGR6	WNT3A	RSPO1	RSPO2	RSPO3	RSPO4	RNF43	ZNRF3
<b>MCF7</b>	relative mRNA Expression (%)	270,5	126,7	0,0	121,0	288,8	0,0	0,0	0,0	81,6	1958,2
	Standardabweichung	212,7	28,4		59,3	177,0				26,1	1650,1
<b>RD</b>	relative mRNA Expression (%)	108,6	242647,5	0,0	30,5	0,0	57,4	0,0	0,0	0,2	2871,7
	Standardabweichung	43,9	77892,8		13,5		37,6			0,2	1089,3
<b>HT29</b>	relative mRNA Expression (%)	2129,2	127219,3	0,0	35,7	0,0	3,6	0,0	0,0	2979,6	24645,7
	Standardabweichung	305,0	69500,2		7,2		2,5			219,9	7724,2
<b>SKBR3</b>	relative mRNA Expression (%)	3375,9	144640,5	70,4	50,2	0,0	0,0	0,0	98,4	2468,0	17309,1
	Standardabweichung	2147,2	46048,7	44,7	4,5				2,3	340,7	7438,3
<b>SKLMS-1</b>	relative mRNA Expression (%)	149,9	101,8	0,0	50,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	3579,6
	Standardabweichung	16,7	36,3		7,2					0,0	127,0
<b>HaCaT</b>	relative mRNA Expression (%)	966,5	343,5	0,0	56,1	0,0	1,0	0,0	0,0	44,6	3808,8
	Standardabweichung	435,8	101,2		28,0		0,6			8,2	269,2
<b>SF767</b>	relative mRNA Expression (%)	178,6	604,3	539,2	33,5	0,0	0,7	0,0	0,0	168,0	1930,1
	Standardabweichung	173,4	392,0	26,4	20,0		0,1			31,9	285,6
<b>HEK293T</b>	relative mRNA Expression (%)	55105,0	88738,4	1343,0	10950,8	16864,9	6150,1	82,7	0,0	2306,1	1331904,5
	Standardabweichung	30432,0	16436,6	470,5	637,1	5750,0	958,5	18,3		807,9	131529,0

## 7.9 Ergebnisse der Microarray Untersuchungen

**Tabelle 7.21: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 in der Zelllinie RD verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_001018109,1	PIR	pirin (iron-binding nuclear protein) (PIR), transcript variant 2	-0,8
NM_133505,2	DCN	decorin, transcript variant C	-1,9
NM_022731,2	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	-1,9
NM_002345,3	LUM	lumican	-1,2
NM_020799,2	STAMBPL1	STAM binding protein-like 1	-1,1
NM_031478,3	FLJ25404	hypothetical protein FLJ25404, transcript variant 2	-1,1
NM_016084,3	RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	1,0
NM_006317,3	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	1,0
NM_002472,1	MYH8	myosin, heavy chain 8, skeletal muscle, perinatal	1,0
NM_024875,2	SYNPO2L	ynaptopodin 2-like	1,0
NM_138571,4	HINT3	histidine triad nucleotide binding protein 3	1,0
NM_002479,3	MYOG	myogenin (myogenic factor 4)	1,1
XM_946253,1	THOC4	THO complex 4	1,2
NM_004997,2	MYBPH	myosin binding protein H	1,2
NM_006308,1	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3	1,2
NM_079422,1	MYL1	myosin, light polypeptide 1, alkali; skeletal, fast, transcript variant 3f	1,3
NM_013292,2	MYLPF	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	1,3
NM_080417,1	SEPT4	septin 4 , transcript variant 2	1,3
NM_002470,1	MYH3	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic	1,4
NM_005159,3	ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1	1,5
NM_002476,2	MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic , transcript variant 2	1,6

**Tabelle 7.22: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA2 in der Zelllinie RD verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA2 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_002345,3	LUM	lumican	-2,3
NM_002982,3	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-2,0
NM_133505,2	DCN	decorin, transcript variant	-1,8
NM_022731,2	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	-1,6
NM_003739,4	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	-1,3

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_004684,2	SPARCL1	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	-1,3
NM_004207,2	SLC16A3	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4), transcript variant 2	-1,3
NM_001547,3	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	-1,2
NM_031478,3	FLJ25404	hypothetical protein FLJ25404, transcript variant 2	-1,1
NM_002157,1	HSPE1	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	-1,1
NM_013292,2	MYLPF	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	-1,1
NM_024625,3	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1, transcript variant 2,	-1,0
NM_012242,2	DKK1	dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	1,0
NM_005627,3	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1, transcript variant 1	1,0
NM_152713,2	STT3A	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,0
XM_946253,1	THOC4	THO complex 4	1,0
NM_024016,2	HOXB8	homeobox B8	1,1
NM_001614,2	ACTG1	actin, gamma 1	1,1
NM_005627,2	SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	1,2
NM_000599,2	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	1,2
NM_006045,1	ATP9A	ATPase, class II, type 9A	1,3
NM_000867,2	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	1,4

**Tabelle 7.23: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 in der Zelllinie HT29 verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_001018109,1	PIR	pirin (iron-binding nuclear protein), transcript variant 2	-0,7
NM_001024912,1	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein), transcript variant 2	-0,7
NM_003226,2	TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)	-1,4
NM_001354,4	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2	-1,1
NM_000574,2	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	1,0
NM_005771,3	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9, transcript variant 1	1,5
NM_006216,2	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	1,5

**Tabelle 7.24: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA2 in der Zelllinie HT29 verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA2 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_002423,3	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	-0,6
XM_495860,2	MUC5AC	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	1,1
NM_005518,2	HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,1
NM_016452,1	CAPN9	calpain 9, transcript variant 2	1,1
NM_176813,3	AGR3	anterior gradient homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	1,1
NM_003890,1	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein	1,2
NM_032044,2	REG4	regenerating islet-derived family, member 4	1,2

**Tabelle 7.25: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5* Expression mittels shRNA1 in der Zelllinie MCF-7 verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5*-Expression mittels shRNA1 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_014372,3	RNF11	ring finger protein 11	-1,6
NM_024299,2	PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog (zebrafish)	-1,3
NM_001909,3	CTSD	cathepsin D	-1,2
NM_003486,5	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	-1,2
NM_020630,3	RET	ret proto-oncogene, transcript variant 2	-1,2
NM_001044390,1	MUC1	mucin 1, cell surface associated, transcript variant 5	-1,2
NM_001552,2	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	-1,1
NM_006645,1	STARD10	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	-1,1
NM_001307,3	CLDN7	claudin 7	-1,1
NM_002157,1	HSPE1	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	-1,1
NM_173554,1	C10orf107	chromosome 10 open reading frame 107	-1,1
NM_004605,2	SULT2B1	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1, transcript variant 1	-1,0
NM_021242,3	MID1IP1	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog (zebrafish)), transcript variant 1	-1,0
NM_001034,1	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-1,0
NM_182470,1	PKM2	pyruvate kinase, muscle, transcript variant 2	-1,0
NM_078467,1	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), transcript variant 1	0,8
NM_001999,3	FBN2	fibrillin 2	1,0
NM_006216,2	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	1,0
NM_014452,3	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	1,0
NM_001005474,1	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta, transcript variant 2	1,2

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_015170,1	SULF1	sulfatase 1	1,2
NM_001719,1	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	1,3
NR_003137,2	RNU4-2	RNA, U4 small nuclear 2, small nuclear RNA	1,3
NM_004438,3	EPHA4	EPH receptor A4	1,4
NM_199169,1	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1, transcript variant 2	1,4
NM_033381,1	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5, transcript variant 1	1,5
NM_013409,1	FST	follistatin, transcript variant FST344	1,5
NR_003925,1	RNU4-1	RNA, U4 small nuclear 1 (RNU4-1), small nuclear RNA	1,6
NM_004454,1	ETV5	ets variant gene 5 (ets-related molecule)	1,7
NM_138634,1	MSMB	microseminoprotein, beta-, transcript variant PSP57	1,7
NM_005252,2	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1,7
NM_001964,2	EGR1	early growth response 1	1,8

Tabelle 7.26: Gene deren mRNA-Gehalt nach Reduktion der *LGR5* Expression mittels shRNA2 in der Zelllinie MCF-7 verändert vorliegt. Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der *LGR5* Expression mittels shRNA2 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_001614,2	ACTG1	actin, gamma 1	-2,1
NM_198276,1	TMEM17	transmembrane protein 17	-1,8
NM_153263,1	ZNF549	zinc finger protein 549	-1,7
NM_017946,2	FKBP14	FK506 binding protein 14, 22 kDa	-1,7
NM_032898,2	C3orf34	chromosome 3 open reading frame 34	-1,7
NM_022350,1	LRAP	leukocyte-derived arginine aminopeptidase	-1,6
NM_022774,1	DEM1	defects in morphology 1 homolog (S, cerevisiae)	-1,6
NM_198271,2	LMOD3	leiomodrin 3 (fetal)	-1,6
NM_004379,2	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1, transcript variant A	-1,5
NM_152361,1	EID2B	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2B	-1,5
NM_024917,4	TRMT2B	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog B (S, cerevisiae)	-1,5
NM_021030,2	ZNF14	zinc finger protein 14	-1,5
NM_021915,1	ZNF69	zinc finger protein 69	-1,5
NM_001080484,1	KIAA1751	KIAA1751	-1,4
NM_012431,1	SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	-1,4
NM_020717,2	SHROOM4	shroom family member 4	-1,4
NM_005431,1	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	-1,4
NM_032164,2	ZNF394	zinc finger protein 394	-1,4
XM_499343,2	PEG10	paternally expressed 10	-1,4
NM_004501,3	HNRNPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A) , transcript variant 2	-1,4
NM_145280,3	FAM119A	family with sequence similarity 119, member A	-1,4

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_197964,1	HSPC268	hypothetical protein HSPC268	-1,4
NM_080876,2	DUSP19	dual specificity phosphatase 19	-1,4
NM_018319,3	TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, transcript variant 1	-1,4
NM_198179,2	QRFPR	pyroglutamylated RFamide peptide receptor	-1,4
NM_000745,2	CHRNA5	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5	-1,4
NR_003611,2	BMS1P5	BMS1 pseudogene 5, non-coding RNA	-1,3
XM_001722366,1	FLJ36131	hypothetical protein FLJ36131, transcript variant 2	-1,3
NM_001007169,1	ZNF483	zinc finger protein 483, transcript variant 2	-1,3
NM_022098,2	XPNPEP3	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 3, putative	-1,3
NM_001001789,1	C21orf24	chromosome 21 open reading frame 24	-1,3
XM_946047,1	PSMD12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	-1,3
NM_152240,1	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3, transcript variant 2	-1,3
NM_080656,1	CDKN2AIPNL	CDKN2A interacting protein N-terminal like	-1,3
NM_032121,3	MAGT1	magnesium transporter 1	-1,3
NM_003666,2	BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1	-1,3
NM_139076,2	FAM175A	family with sequence similarity 175, member A	-1,3
NR_002808,1	C14orf85	chromosome 14 open reading frame 85, non-coding RNA,	-1,3
NM_207672,1	GRIPAP1	GRIP1 associated protein 1, transcript variant 2	-1,2
NM_001007278,1	TRIM13	tripartite motif-containing 13, transcript variant 4	-1,2
NM_024640,3	YRDC	yrnC domain containing (E. coli), nuclear gene encoding mitochondrial protein	-1,1
NM_184041,1	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate, transcript variant 2,	-1,1
NM_133279,1	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for, transcript variant 9	-1,1
NM_032886,1	TMEM137	transmembrane protein 137, misc RNA	-1,1
NM_175066,2	DDX51	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51	-1,1
NM_024881,3	SLC35E1	solute carrier family 35, member E1	-1,0
NM_024095,3	ASB8	ankyrin repeat and SOCS box-containing 8	-1,0
NM_001031711,1	ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1, transcript variant 1	1,0
NM_004140,3	LLGL1	lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila)	1,1
NR_003137,2	RNU4-2	RNA, U4 small nuclear 2, small nuclear RNA	1,1
NM_000599,2	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	1,1
NM_006853,2	KLK11	kallikrein-related peptidase 11, transcript variant 2	1,2
NR_003925,1	RNU4-1	RNA, U4 small nuclear 1, small nuclear RNA	1,3
NM_012133,2	COPG2	coatamer protein complex, subunit gamma 2	1,4
NM_000945,3	PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform	1,4
NM_002038,2	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6, transcript variant 3	1,4
NM_003487,2	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa, transcript variant 1	1,4

**Tabelle 7.27: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Transduktion des LGR5Δ5-Expressionsplasmids in der Zelllinie MCF-7 verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der LGR5-Expression mittels shRNA1 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level.

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_020311,1	CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	1,0
NR_003137,2	RNU4-2	RNA, U4 small nuclear 2, small nuclear RNA	1,1
NR_003925,1	RNU4-1	RNA, U4 small nuclear 1, small nuclear RNA	1,4
NM_001753,3	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	1,5

**Tabelle 7.28: Gene, deren mRNA-Gehalt nach Transduktion des LGR5FL-Expressionsplasmids in der Zelllinie MCF-7 verändert vorliegt.** Gene mit einem negativen Fold change (Log2) weisen nach Reduktion der LGR5-Expression mittels shRNA1 einen verringerten mRNA-Level auf, die mit einem positiven Fold change (Log2) einen erhöhten mRNA-Level

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_184041,1	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate, transcript variant 2	-1,4
NM_005022,2	PFN1	profilin 1	-1,2
NM_001909,3	CTSD	cathepsin D	-1,2
NM_182470,1	PKM2	pyruvate kinase, muscle, transcript variant 2	-1,2
NM_199444,1	COPE	coatomer protein complex, subunit epsilon, transcript variant 2	-1,1
NM_021242,3	MID1IP1	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog (zebrafish)), transcript variant 1	-1,1
NM_024299,2	PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog (zebrafish)	-1,1
NM_001614,2	ACTG1	actin, gamma 1	-1,1
NM_181738,1	PRDX2	peroxiredoxin 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3	-1,0
NM_002346,1	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	-1,0
NM_005118,2	TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	1,0
NM_018177,2	N4BP2	Nedd4 binding protein 2	1,0
NM_012431,1	SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	1,0
NM_019119,3	PCDHB9	protocadherin beta 9	1,0
NM_032679,1	ZNF577	zinc finger protein 577	1,0
XM_001722366,1	FLJ36131	hypothetical protein FLJ36131, transcript variant 2	1,0
NM_033109,3	PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	1,1
NM_198276,1	TMEM17	transmembrane protein 17	1,1
NM_197964,1	HSPC268	hypothetical protein HSPC268	1,1
NM_017946,2	FKBP14	FK506 binding protein 14, 22 kDa	1,1
NM_018319,3	TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, transcript variant 1	1,1
NM_001040025,1	ARL16	ADP-ribosylation factor-like 16	1,1
NM_001080973,1	IL17RD	interleukin 17 receptor D, transcript variant 1	1,1
NM_133459,1	CCBE1	collagen and calcium binding EGF domains 1	1,1
NM_014897,1	ZNF652	zinc finger protein 652	1,1
NM_145041,1	TMEM106A	transmembrane protein 106A	1,1

NCBI Nr.	Gensymbol	Definition	Fold change (Log2)
NM_001005335,1	HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, transcript variant 2	1,1
NM_025152,1	NUBPL	nucleotide binding protein-like	1,1
NR_002808,1	C14orf85	chromosome 14 open reading frame 85, non-coding RNA	1,1
NM_012388,2	PLDN	pallidin homolog (mouse)	1,1
NM_080876,2	DUSP19	dual specificity phosphatase 19	1,1
NR_002894,1	HIATL2	hippocampus abundant transcript-like 2, non-coding RNA	1,1
NM_021030,2	ZNF14	zinc finger protein 14	1,1
NR_002220,1	DUXAP3	double homeobox A pseudogene 3 on chromosome 10	1,1
NM_001080484,1	KIAA1751	KIAA1751	1,1
NM_018561,3	USP49	ubiquitin specific peptidase 49	1,2
NM_172097,1	CATSPER2	cation channel, sperm associated 2, transcript variant 4	1,2
NM_000745,2	CHRNA5	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5	1,2
NM_152361,1	EID2B	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2B	1,2
NM_178324,1	SPTLC1	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1, transcript variant 2	1,2
NM_007068,2	DMC1	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast)	1,2
NR_001561,1	CYCSL1	cytochrome c, somatic-like 1 on chromosome 6	1,2
XM_942096,1	FLJ40722	hypothetical protein FLJ40722, transcript variant 3	1,2
NM_139076,2	FAM175A	family with sequence similarity 175, member A	1,2
NM_152444,1	PTGR2	prostaglandin reductase 2	1,3
NM_020717,2	SHROOM4	shroom family member 4	1,3
NM_207672,1	GRIPAP1	GRIP1 associated protein 1, transcript variant 2	1,3
NM_000230,1	LEP	leptin (obesity homolog, mouse)	1,3
NM_005431,1	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	1,3
NM_032164,2	ZNF394	zinc finger protein 394	1,3
NM_033412,1	MCART1	mitochondrial carrier triple repeat 1	1,4
NM_198549,1	FAM73A	family with sequence similarity 73, member A	1,4
NM_176811,2	NLRP8	NLR family, pyrin domain containing 8	1,5

## Danksagung

Ich bedanke mich bei...

Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert für die Überlassung des interessanten, vielseitigen Themas und die wissenschaftliche Unterstützung.

Prof. Dr. med. Dirk Vordermark für die Möglichkeit diese Arbeit in der AG Molekulare Strahlenbiologie anfertigen zu können sowie für die Übernahme der Betreuung an der Medizinischen Fakultät.

Prof. Dr. rer. nat. Hauke Lilie für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit, was mir ermöglichte diese Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät verteidigen zu können.

Prof. Dr. med. Dr. dent. Alexander W. Eckert dafür, dass er es mir ermöglichte diese Arbeit in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie fort zu führen zu können sowie für die Bereitstellung der klinischen Proben und die aufmunternden Worte beim Holen der Tumorproben- wir wollen nicht, dass Sie hier umkippen-.

Dr. rer. nat. Matthias Bache für die zahlreichen, hilfreichen Hinweise und Hilfestellungen sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. rer. nat. Matthias Kappler, der mir jederzeit mit Tat und Rat zur Seite stand für seine kontinuierliche, tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen bei Problemen, welche erst die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Prof. Dr. med. habil. Peter Würfl für die Bereitstellung der WTS-Tumorproben und der zugehörigen Datenbanken.

Dr. rer. nat. Knut Krohn (IZKF Leipzig) für die Durchführung der Mikroarray-Analysen.

Dr. med. Udo Bilkenroth (Pathologie Eisleben) für pathologische Begutachtung der HE-Schnitte der oralen Plattenepithelkarzinomproben und Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen (Institut für Pathologie Halle) für die pathologische Begutachtung der HE-Schnitte der Weichteilsarkomproben.

Rudolf Jung (Universität Regensburg) für die Durchführung der TMAs.

Jana Beer (Institut für Pathologie) für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und Dr. med. Daniel Bethman (Institut für Pathologie) für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Auswertung dieser.

AG. Hüttelmaier für die Überlassung vieler Plasmide und Zellen sowie für die Möglichkeit verschiedene Geräte zu nutzen.

AG. Pneumologisches Forschungslabor, AG Gastrointestinale Onkologie und AG Molekulare Hepatologie für die Möglichkeit das S2-Labor, das Mikroskop, den -80°C-Schrank und manch anderes Gerätchen nutzen zu dürfen sowie für die ständige Bereitschaft mit Chemikalien und Materialien auszuweichen, wenn Not am Mann(Frau) war und besonders für die gute Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre im gesamten FG06E02.

Dr. rer. nat. Thomas Greither (Zentrum für Andrologie und Reproduktionsmedizin) für seine freundliche und hilfreiche Unterstützung, die Bereitschaft diese Arbeit korrekturlesen und die vielen kleinen Ironietropfen, welche den Laboralltag jedesmal aufs Neue verschönern.

den guten Seelen unseres Labors Gabrielle Thomas und Kathrin Theile (ehemals Spröte) für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Koordination des Laboralltags.

allen Studenten der Biologie und Biochemie, die ich während dieser Zeit bei der Erstellung ihrer Bachelor und Masterarbeiten unterstützen durfte, dadurch habe ich sehr viel gelernt.

besonders bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Molekulare Strahlenbiologie und MKG: Antje Güttler, Ulrike Papst, Jacqueline Kessler, Tom Kaune und Johanna Kotroba für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die allwährende Hilfsbereitschaft. Und ins Besondere bei Dr. rer. nat. Henri Wichmann für die Unterstützung in der letzten Fertigstellungsphase sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde und ich mich zu keinem anderen Zeitpunkt in dieser Universität oder einer anderen Einrichtung um die Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Halle (Saale), den

Swetlana Rot

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Name Swetlana Rot

### Akademische Ausbildung

---

seit 10/2006 Promotion zum Dr. rer. nat.  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie und  
Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastischen  
Gesichtschirurgie  
Thema: „Molekulare Charakterisierung des Stammzellmarkers *LGR5* und  
der Spleißvariante *LGR5Δ5* in humanen Tumoren“

11/2005-10/2006 Anfertigung der Diplomarbeit  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Pathologie und Klinik für Strahlentherapie  
Thema: „Bedeutung von Survivin und Hif 1alpha für die Hypoxie-  
induzierte Strahlenresistenz humaner WTS-Zelllinien“

10/2001-10/2006 Studium der Biochemie  
Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg

## Publikationen

Kappler, Matthias; Pabst, Ulrike; Rot, Swetlana; Taubert, Helge; Wichmann, Henri; Schubert, Johannes et al. (2016): Normoxic accumulation of HIF1 $\alpha$  is associated with glutaminolysis. In: Clinical oral investigations. DOI: 10.1007/s00784-016-1780-9.

Kessler, Jacqueline; Güttler, Antje; Wichmann, Henri; Rot, Swetlana; Kappler, Matthias; Bache, Matthias; Vordermark, Dirk (2015): IDH1(R132H) mutation causes a less aggressive phenotype and radiosensitizes human malignant glioma cells independent of the oxygenation status. In: Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology 116 (3), S. 381–387. DOI: 10.1016/j.radonc.2015.08.007.

Wichmann, Henri; Güttler, Antje; Bache, Matthias; Taubert, Helge; Rot, Swetlana; Kessler, Jacqueline et al. (2015): Targeting of EGFR and HER2 with therapeutic antibodies and siRNA: a comparative study in glioblastoma cells. In: Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al] 191 (2), S. 180–191. DOI: 10.1007/s00066-014-0743-9

Bache, Matthias; Rot, Swetlana; Keßler, Jacqueline; Güttler, Antje; Wichmann, Henri; Greither, Thomas et al. (2015): mRNA expression levels of hypoxia-induced and stem cell-associated genes in human glioblastoma. In: Oncology reports 33 (6), S. 3155–3161. DOI: 10.3892/or.2015.3932.

Rot, Swetlana; Taubert, Helge; Bache, Matthias; Greither, Thomas; Würfl, Peter; Eckert, Alexander W. et al. (2011): A novel splice variant of the stem cell marker LGR5/GPR49 is correlated with the risk of tumor-related death in soft-tissue sarcoma patients. In: BMC cancer 11, S. 429. DOI: 10.1186/1471-2407-11-429.

Kessler, Jacqueline; Hahnel, Antje; Wichmann, Henri; Rot, Swetlana; Kappler, Matthias; Bache, Matthias; Vordermark, Dirk (2010): HIF-1 $\alpha$  inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells. Effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. In: BMC cancer 10 (1), S. 605. DOI: 10.1186/1471-2407-10-605.

Bache, Matthias; Kappler, Matthias; Wichmann, Henri; Rot, Swetlana; Hahnel, Antje; Greither, Thomas et al. (2010): Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. In: BMC cancer 10, S. 132. DOI: 10.1186/1471-2407-10-132.

Kappler, Matthias; Taubert, Helge; Holzhausen, Hans-Jürgen; Reddemann, Rolf; Rot, Swetlana; Becker, Axel et al. (2008): Immunohistochemical detection of HIF-1 $\alpha$  and CAIX in advanced head-and-neck cancer. Prognostic role and correlation with tumor markers and tumor oxygenation parameters. In: Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al] 184 (8), S. 393–399.

Kappler, M.; Rot, S.; Taubert, H.; Greither, T.; Bartel, F.; Dellas, K. et al. (2007): The effects of knockdown of wild-type survivin, survivin-2B or survivin-delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions. In: Cancer gene therapy 14 (12), S. 994–1001. DOI: 10.1038/sj.cgt.7701090.