

Einfluss einer veränderten Expression des  
leucine-rich repeat-containing G-Protein gekoppelten Rezeptors 5 (LGR5)  
auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität  
von HNSCC-Tumorzelllinien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sarah Blauschmidt

Betreuer:

Prof. Dr. Dr. Alexander W. Eckert

Gutachter:

Prof. Dr. Dirk Vordermark, Halle (Saale)

Prof. Dr. Andreas Kolk, Innsbruck (AT)

Datum der Verteidigung:

04.06.2024

Meinen Eltern

## Referat

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) nehmen durch späte Diagnosezeitpunkte, hohe Metastasierungs- und Rezidivraten sowie ungenügende Therapieverfahren, häufig einhergehend mit starker Lebensqualitätseinschränkung, einen besonderen Stellenwert unter den Krebserkrankungen ein. Als eine generelle Ursache von Krebserkrankungen wird u.a. die Deregulation von Tumorstammzellen im Gewebe verantwortlich gemacht. Ein bekannter Tumorstammzellmarker ist der Oberflächenrezeptor leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (LGR5). Dieser gilt auch als Regulator und Targetgen des Wnt-Signalweges. Für HNSCC sind die Bedeutung von LGR5 und seine potenzielle Nutzung als therapeutisches Target jedoch bisher nur ungenügend erforscht. Diese Arbeit soll zum weiteren Verständnis zellulärer Mechanismen beitragen, die durch LGR5 beeinflusst werden. Hierfür wurden die Auswirkungen einer veränderten LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität einer Zungenkarzinom- und einer Hypopharynxkarzinomzelllinie nach Stimulation mit den Wnt-Signalweg-Agonisten Wnt3a und R-Spondin-1 untersucht. Zunächst erfolgte mithilfe eines TOPFlash/FOPFlash-Assays die Bestimmung geeigneter Ligandenkonzentrationen, um eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu induzieren. Anschließend wurde mittels Koloniebildungstests der IC50-Wert für die Cisplatinkonzentration beider Zelllinien eruiert und zwei Bestrahlungsdosen für die geplante Radiotherapie ausgewählt. In den Hauptversuchen wurde das klonogene Überleben der beiden Zelllinien in Abhängigkeit von den verschiedenen LGR5-Expressionen ohne therapeutische Behandlung, nach alleiniger Chemotherapie, alleiniger Strahlentherapie und nach einer Kombination beider Therapieformen untersucht. Abschließend fand mittels qPCR eine Analyse der Expression tumorrelevanter Gene, sowie Wnt-Signaling assoziierter Gene auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit von der Modulation der LGR5-Expression und therapeutischen Behandlung statt. Der Effekt der LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten war zelllinienabhängig. In Zellen der Zungenkarzinomzelllinie zeigten sich eine Tendenz zur Resistenzerhöhung gegenüber Radiotherapie nach LGR5 Delta5-Überexpression und nach LGR5-Knockdown, sowie eine Tendenz zur Sensitiverung nach LGR5 full-length-Überexpression. Nach Kombinationstherapie von Bestrahlung und Cisplatin kam es zu einer Hochregulation der Epithelial-mesenchymalen-Transitions-Marker CLCA2 und E-Cadherin. In der Hypopharynxkarzinomzelllinie konnte eine Sensitiverung sowohl gegenüber Radio- als auch Cisplatintherapie nach einem LGR5-Knockdown gezeigt werden. Hier wurde außerdem eine Hochregulation der mRNA-Level von Vimentin nach LGR5-Knockdown festgestellt. Ein *in vitro*-Modell zeigt natürlich methodische Schwächen, weshalb die hier gewonnenen Erkenntnisse perspektivisch z.B. im Mausmodell fortführend untersucht werden sollten.

Blauschmidt, Sarah: Einfluss einer veränderten Expression des leucine-rich repeat-containing G-Proteingekoppelten Rezeptors 5 (LGR5) auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität von HNSCC-Tumorzelllinien, Halle (S.), Univ., Med. Fak., Diss., 80 S., 2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Krebserkrankungen in der Medizin	1
1.1.1.	Stellenwert von Kopf-Hals-Tumoren, speziell Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	1
1.2.	Allgemeine Tumorbiologie	3
1.3.	Der kanonische Wnt-Signalweg	5
1.4.	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	8
1.4.1.	LGR5 – Aufbau, Funktion und klinische Relevanz	10
1.4.2.	LGR5-Expression in HNSCC	12
1.5.	Therapie von HNSCC	13
1.5.1.	Neue Therapieansätze	14
2.	Zielstellung	15
3.	Material und Methodik	16
3.1.	Material	16
3.1.1.	Verwendete Zelllinien	16
3.1.2.	Chemikalien und Reagenzien	17
3.1.3.	Geräte und Verbrauchsmittel	19
3.2.	Methodik	20
3.2.1.	Zellbiologische Methoden	20
3.2.2.	Molekulare Methoden	27
3.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.4.	Statistische Analysen	32
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR	34
4.2.	Ermittlung der optimalen Konzentration für eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Zelllinien FaDu und Cal33	34
4.3.	Ermittlung des IC50-Wertes für Cisplatin	35
4.4.	Bestrahlungsvorversuche	36
4.5.	Untersuchung des strahlenbiologischen Verhaltens und der Chemosensitivität nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 von Zellen mit veränderter LGR5-Expression	36
4.5.1.	Effekt der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten zur Modulation der LGR5-Expression	37
4.5.2.	Einfluss der Modulation der LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten	39
4.5.3.	Einfluss der Modulation der LGR5-Expression auf die Chemosensitivität	44
4.5.4.	Effekt der Modulation der LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten	

	und die Chemosensitivität nach kombinierter Behandlung	46
4.6.	Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR und Westernblot	53
4.7.	Expression tumorassoziierter Marker in Abhängigkeit der LGR5-Modulation und therapeutischen Behandlung	55
4.7.1.	Vimentin	56
4.7.2.	CLCA2	57
4.7.3.	E-Cadherin	57
4.8.	Expression Wnt-Signaling assoziierter Gene abhängig von der LGR5-Modulation	58
4.8.1.	LGR4 und LGR6	58
4.8.2.	Wnt3a	59
5.	Diskussion	60
5.1.	Optimale Konzentration für eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Zelllinien FaDu und Cal33	60
5.2.	Ermittlung des IC50-Wertes für Cisplatin	61
5.3.	Effekt der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten auf das klonogene Überleben	61
5.4.	Einfluss einer veränderten LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität der Zelllinien Cal33 und FaDu nach Stimulierung mit Wnt3a und RSPO1	62
5.5.	Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR	66
5.6.	Expression tumorassoziierter Marker in Abhängigkeit von der LGR5-Expression und therapeutischen Behandlung	68
5.7.	Expression Wnt-Signaling assoziierter Marker in Abhängigkeit von der LGR5-Expression	69
5.8.	Zuverlässigkeit des <i>in vitro</i> -Modells	69
6.	Zusammenfassung und Ausblick	71
7.	Literaturverzeichnis	73
8.	Thesen	80
9.	Anhang	

## Abkürzungsverzeichnis

5JÜ - 5-Jahres-Überlebensrate

AG - Arbeitsgruppe

APC - adenomatous-polyposis-coli protein

Aqua (bi-)dest. - (bi-)destilliertes Wasser

Asn - Asparagin

ATP - adenosin triphosphate

BSA - bovine serum albumin

bzw. - beziehungsweise

CA - Kalifornien

CCND1 - Cyclin D1

cDNA - complementary deoxyribonucleic acid

CK1 $\alpha/\gamma$  - casein kinase 1 $\alpha/\gamma$

cm(2) - (Quadrat-)Zentimeter

CO<sub>2</sub> - Kohlenstoffdioxid

CP - Cisplatin

CRC - colorectal cancer

CSC - cancer stem cell, Tumorstammzelle

CT - cycle treshold

CTNNB1-Gen - catenin beta 1 gene

Delta5 - Abkürzung in allen Abbildungen für die LGR5 Spleißvariante LGR5 Delta5

DKK - dickkopf-related protein

DMEM - Dulbecco's modified eagle medium

DMF - dose modifying factor

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonucleic acid

DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline

Dvl - dishevelled protein

EBV - Epstein-Barr-Virus

ECL - enhanced chemiluminescence

EF - enhancement factor

EGFR - epidermal growth factor-receptor

EMT - epithelial-mesenchymal transition

FAP - familial adenomatous polyposis

FKS - fetales Kälberserum

FSHR - follicle-stimulating hormone receptor

Fz - frizzled protein  
g - Gramm  
G1-Zellen - Zellen in der G1-Phase (engl. gap phase) des Zellzyklus  
GDP - guanosine diphosphate  
GPCR - G protein-coupled receptor  
G-Protein - guanine nucleotide-binding protein  
GSK3 - glycogen synthase kinase 3  
GTP - guanosine triphosphate  
Gy - Gray  
h - Stunde(n)  
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonic acid  
HNSCC - head and neck squamous cell carcinoma/ Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich  
HPV - human papillomavirus  
Int-1 - integration-1 protein  
kb - kilobase  
kDa - kilodalton  
LA - Louisiana  
LDL - low density lipoprotein  
LEF - lymphocyte enhancer factor  
LDS - lithium dodecyl sulfate  
LGR1/2/3/4/5/6/7/8 - Abkürzung im Text für leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 1/2/3/4/5/6/7/8  
LGR5 - Abkürzung in allen Abbildungen für LGR5 full-length  
LGR5FL - LGR5 full-length  
LGR5 Delta5 - LGR5-Delta5-Spleißvariante  
LHCGR - luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor  
LRP5/6 - low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6  
M - Molar  
MA - Massachusetts  
mA - Milliampere  
min - Minute(n)  
ml - Milliliter  
mM - Millimolar  
mRNA - messenger ribonucleic acid  
MET - mesenchymal-epithelial transition  
MN - Minnesota

MO - Missouri  
MV - Megavolt  
MYC, auch c-Myc - MYC Proto-Onkogen (von Myelocytomatose-Onkogen)  
Mw - Mittelwert  
NaCl - Natriumchlorid  
NAD - nicotinamide adenine dinucleotide  
ng - Nanogramm  
nm - Nanometer  
Oct-3/4 - octamer binding transcription factor 3/4  
OED - oral epithelial dysplasia  
OSCC - oral squamous cell carcinoma  
PBS - phosphate buffered saline  
PBST - PBS mit Tween® 20  
PCR - polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion  
PE - Plattiereffizienz  
PD-L1 - programmed death-ligand 1  
qRT-PCR - quantitative real-time-PCR  
RNA - ribonucleic acid  
RNase - Ribonuklease  
RNF43 - ring finger 43  
rpm - rotations per minute, Umdrehungen pro Minute  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium  
RSPO1-4 - R-Spondin- 1-4  
s - Sekunde(n)  
SDS - sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SF - survival fraction, Überlebensfraktion  
SF<sub>10</sub> – survival fraction von 10%  
SFRP - secreted frizzled-related protein  
shRNA - small hairpin ribonucleic acid  
SOX2 - (sex determining region Y)-box 2  
st. - stimuliert  
stim. - stimuliert  
SV-Promotor - simian virus 40-Promotor  
TCF - T-cell factor  
TK - thymidin kinase  
TSHR - thyroid stimulating hormone receptor

U - Unit(s)

UV - Ultraviolett

V - Volt

VEGF - vascular endothelial growth factor

Vollmedium RPMI 1640 - Medium mit Zusatz von 2% Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin),  
10% fetalem Kälberserum und 1% Pyruvat

Wg - wingless protein

ZNRF3 - zinc and ring finger 3

$\beta$ -TrCP - betatransducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

$\mu$ g - Mikrogramm

$\mu$ m - Mikrometer

$\mu$ M - Mikromolar

unst. - unstimuliert

$\mu$ l - Mikroliter

$^{\circ}$ C - Grad Celsius

# 1. Einleitung

## 1.1. Krebserkrankungen in der Medizin

Nach Zählungen des Robert-Koch-Instituts verstarben im Jahr 2016 in Deutschland von insgesamt 910.902 Menschen 229.827 an einer Krebserkrankung. Dies entspricht 25,2%. Hierzu wurden alle bösartigen Neoplasien einschließlich der Lymphome und Leukämien gezählt. Von den an Krebs Verstorbenen waren 45,8% Frauen und 54,2% männlichen Geschlechts. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (RKI 2019). Die Inzidenz aller Krebsneuerkrankungen betrug im Jahr 2016 in etwa 492 000 (RKI 2019). Dabei ist die Prognose je nach Tumorart sehr unterschiedlich. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate (5JÜ) im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung reicht von sehr günstigen Verläufen wie z.B. beim malignen Melanom, Hoden- und Prostatakrebs von etwa 90% bis hin zu weniger als 20% 5JÜ bei malignen Tumorerkrankungen z.B. der Lunge, Leber, des Pankreas oder beim Mesotheliom.

Trotz der Tatsache, dass sich die Aussichten auf ein längeres Überleben nach einer Krebsdiagnose durch medizinischen Fortschritt in den letzten Jahrzehnten stark verbessert haben (RKI 2017), verdeutlichen diese Zahlen, dass Krebserkrankungen noch immer zu den tödlichsten Erkrankungen zählen und deren Therapie die gesamte medizinische Welt vor Herausforderungen stellt.

Nach Diagnose einer malignen Neoplasie wird stets ein Staging vorgenommen und der Tumor mittels verschiedener diagnostischer Verfahren in ein Tumorstadium eingeteilt. Das standardisierte Klassifikationssystem ist die TNM-Klassifikation solider Tumoren, bei der das Tumorstadium nach der Tumorgröße (T), dem regionären Lymphknotenstatus (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) bestimmt wird.

Auch wenn bisher nicht für jede Tumorart konkrete auslösende Faktoren bestimmt werden konnten, so sind mittlerweile mehrere Einflussgrößen bekannt, die das Risiko an Krebs zu erkranken, erhöhen. Neben diversen anderen Faktoren sind in Deutschland derzeit etwa 19% aller Krebserkrankungen pro Jahr auf Tabakkonsum zurückzuführen. Ein ebenso großer Risikofaktor ist der regelmäßige Alkoholkonsum und die als Bestandteile des metabolischen Syndroms und der damit verbundenen Stoffwechselschieflage geltenden Faktoren Übergewicht, Adipositas und Bewegungsmangel (RKI 2019).

### 1.1.1. Stellenwert von Kopf-Hals-Tumoren, speziell Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Zu den Kopf-Hals-Tumoren zählen per definitionem alle Tumoren, unterschiedlicher Entität,

welche im Kopf-Hals-Bereich ihren Ursprung haben. Dieser umfasst die Mundhöhle, mit u.a. Zungen-, Zungengrund-, Mundboden-, Gaumen-, Zahnfleisch-, und Speicheldrüsentumoren, den Nasenrachenraum mit Pharynxtumoren (Hypo-, Oro- und Nasopharynxtumoren), Neoplasien der Nase und der Nasennebenhöhlen, den Kehlkopf, bei dem man je nach Lokalisation in Glottis-, supra-, trans- und subglottische Tumoren unterscheidet, die Lippen mit Basaliomen, und Plattenepithelkarzinomen, das äußere und innere Ohr und den Halsbereich, in denen es u.a. zu Neoplasien von Weichteilgewebe, Gefäßen und Nerven kommen kann. Tumoren der Schilddrüse sowie Melanome im Kopf-Hals-Bereich werden meist separat eingeteilt.

Unter den HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) werden alle Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich zusammengefasst. Mit einem Anteil von 87% in der histologischen Untersuchung sind sie unter allen bösartigen Neubildungen von Mundhöhle und Rachen mit Abstand am häufigsten. Adenokarzinome vor allem der Speicheldrüsen kommen mit einem Anteil von 4% am zweithäufigsten vor (ZfKD 2021, 2021).

Je nach Lokalisation wird die operative Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren von Ärzten und Ärztinnen des Fachgebiets der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie oder auch der Neurochirurgie übernommen. Häufig ist jedoch auch eine interdisziplinäre Zusammenarbeit notwendig.

Eine maligne Neoplasie im Mundhöhlen-, Rachen- und Kehlkopfbereich wurde bei Männern in Deutschland im Jahr 2016 etwa 2,7 Mal häufiger diagnostiziert als bei Frauen. Mit im Mittel 63 Jahren lag das Erkrankungsalter von Männern bei Erstdiagnose einer bösartigen Tumorerkrankung im Mundhöhlen- und Rachenbereich ca. drei Jahre vor dem von Frauen. Im Fall von bösartigen Tumorerkrankungen des Kehlkopfs lag das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Erstdiagnose bei Frauen mit 64 Jahren etwa zwei Jahre vor dem von Männern mit 66 Jahren. So erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland 12850 Männer und nur 4690 Frauen neu an einer Krebserkrankung im Mundhöhlen-, Rachen- und Kehlkopfbereich (RKI 2019). Insgesamt machten die Tumoren in diesem Bereich in Deutschland bei Männern 5% und bei Frauen 2% aller Krebsneuerkrankungen im Jahr 2016 aus (RKI 2019). Im weltweiten Vergleich haben Kopf-Hals-Tumoren einen ähnlichen, teilweise noch höheren Stellenwert. 2002 schätzte die WHO die jährliche Inzidenz maligner Kopf-Hals-Tumoren auf 600 000 Fälle und die Zahl der daran Verstorbenen auf 300 000, womit sie zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen weltweit zählen. Dabei sind die Industriestaaten weniger betroffen und die höchsten Fallzahlen stammen aus Südostasien. In der westlichen Welt ist jedoch ein Anstieg der durch HPV ausgelösten Kopf-Hals-Tumoren zu beobachten (Mehanna *et al.*, 2010; Mathers and Loncar, 2006)). Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich bleiben bis heute v.a. durch späte Diagnosezeitpunkte, unzureichende Screening-Methoden und häufig Lebensqualität einschränkende Therapiemöglichkeiten eine Herausforderung.

Die Prognose nach einer Krebsdiagnose im Kopf-Hals-Bereich ist sehr unterschiedlich und stark

abhängig von der Lokalisation, dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem TNM-Stadium bei Therapiebeginn. Durchschnittlich wird die 5JÜ mit 40% - 60% angegeben (Pulte and Brenner, 2010). Laut des Gesundheitsberichtes des Robert-Koch-Instituts von 2016 liegt die relative 5JÜ für Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachenraums in Deutschland bei Frauen mit 63% höher als bei Männern mit 47%. Diese Verteilung kommt u.a. dadurch zustande, dass Männer häufiger an durch Tabak- und Alkoholkonsum verursachten Krebserkrankungen des Mundbodens, der Zunge, des Rachens und des Kehlkopfs leiden, welche mit einer geringeren 5JÜ einhergehen als z.B. Karzinome von Lippen und Speicheldrüsen bei Frauen. Außerdem werden Tumoren weiblicher Patientinnen häufiger in einem sehr frühen T-Stadium (0/1) erkannt, während Männer oft bereits an sehr fortgeschrittenen Tumorerkrankungen leiden. Bei letzteren wird nur in jedem siebten Fall ein solch frühes T-Stadium diagnostiziert. Insgesamt sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten bei beiden Geschlechtern im ersten Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts jedoch leicht angestiegen. Seit 2011 ist bei Frauen eine Konstanz der Sterberate und bei Männern ein geringer Rückgang zu beobachten (RKI 2019).

Als Hauptrisikofaktoren für alle Krebserkrankungen der Mundhöhle, des Rachens und des Kehlkopfes wurden der Konsum von Tabak und Alkohol festgestellt, wobei das Risikopotenzial bei Kombination dieser Faktoren noch einmal deutlich verstärkt wird (Maier *et al.*, 1992). Außerdem gilt eine chronische Infektion mit Vertretern der Hochrisikogruppe der humanen Papilloma-Viren (HPV) als ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen (Löning *et al.*, 1985; Hammarstedt *et al.*, 2006). Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) wird als Risikofaktor v.a. für Nasopharynxkarzinome betrachtet (Vokes *et al.*, 1997).

Weitere Risikofaktoren sind eine einseitige und vitaminarme Ernährung (Uzcudun *et al.*, 2002), unzureichende Mundhygiene oder mechanische Irritationen, z.B. durch Prothesen (Maier *et al.*, 1993). Auch UV-Strahlung spielt vor allem in der Entstehung von Lippenkarzinomen eine Rolle. Ein erhöhtes Risiko tragen ebenfalls Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2, ausgeprägter Immunschwäche, sowie genetischen Vorbelastungen.

## 1.2. Allgemeine Tumorbiologie

Höhere Organismen sind dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gesamtheit ihrer Zellen in funktionellen Gruppen organisieren, die bereits während der Embryogenese die Bildung von Geweben und Organen ermöglichen. Der kontrollierte Ablauf aller zellulären Aufgaben ist dabei sowohl während der Entwicklung als auch nach Abschluss des Wachstums essenziell. Um diesen Ablauf zu garantieren, ist in vielen Geweben eine permanente Regeneration von Zellen nötig, wobei eine stetige Homöostase aus Zellwachstum, -differenzierung und programmiertem Zelltod

herrscht. Durch u.a. oben genannte Risikofaktoren der Krebsentstehung ist eine Schädigung auf DNA-Ebene und damit eine Störung dieser Homöostase zwischen Proliferation und Apoptose möglich. Es kommt zu Mutationen oder irreversiblen epigenetischen Veränderungen (DNA-Methylierungen). Möglich sind *gain of function* Mutationen und *loss of function* Mutationen von Genen, welche Proliferation oder Apoptose kontrollieren. Bei Akkumulation mehrerer solcher Mutationen kann es, auch über einen sehr langen Zeitraum hinweg, zu einer exzessiven lokalen Proliferation und Induktion einer bösartigen Neoplasie kommen (Bertram, 2000).

Eine Beschreibung dieser genetischen Zusammenhänge mit der Karzinogenese ist bereits im Anfang der 90er Jahre veröffentlichten ‚multistep carcinogenesis model‘ zu finden (Vogelstein and Kinzler, 1993). Daneben gab es noch viele weitere Ansätze zur Erklärung von Tumorentstehung und Progression, z.B. das Modell der klonalen Evolution von Peter C. Nowell (Nowell, 1976) oder das Tumorstammzellmodell, entwickelt von Bonnet und Dick (Bonnet and Dick, 1997; Dick, 2008). In diesen Modellen ist die Existenz verschiedener Zellpopulationen innerhalb eines Tumors beschrieben. Diese Populationen sind hierarchisch geordnet und unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Kinetik und ihren Fähigkeiten zu Regeneration und Wachstum. Es werden Selektionsprozesse durchlaufen und so können Zellen neue Fähigkeiten erlangen. Das Tumorstammzellmodell besagt, dass nur eine kleine Subpopulation eines Tumors, die Tumorstammzellen (CSC- cancer stem cells), entsprechend den adulten Stammzellen in gesundem Gewebe, der Formierung aller für den hierarchischen Aufbau des Tumors nötigen Zellen befähigt sind (Clarke *et al.*, 2006; Clarke and Hass, 2006).

2014 postulierten Kreso und Dick eine Zusammenführung des genetischen Ansatzes und des Tumorstammzellmodells, wobei sie darlegten, dass sowohl genetische Diversität als auch nichtgenetische Einflüsse zur Heterogenität in einem Tumor beitragen (Kreso and Dick, 2014).

Im Falle einer malignen Neoplasie können Zellen im Verlauf der Tumorgenese, wie beschrieben, über diverse Selektionsprozesse neue Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Immortalität, erwerben. Diese gehören zu den typischen Stammzeleigenschaften. Subpopulationen eines Tumors können der lokalen Induktion von Angiogenese und autonomer Versorgung, Invasion, sowie der Migration fähig werden, was eine Primärtumorzelle u.a. zur Metastasierung befähigt. Dafür lösen sich einzelne Zellen oder kleine Zellgruppen aus dem Tumorzellverband, werden vom Blut- und Lymphgefäßsystem erfasst, abtransportiert und siedeln sich an neuer Stelle an. Die Fähigkeiten und Oberflächeneigenschaften der Zellen ermöglichen es ihnen, sich z.B. in nahen Lymphknoten oder auch in fernen Geweben, zu integrieren, die Basalmembran zu durchbrechen und die Neubildung von Blutgefäßen zu ihrer eigenen Versorgung zu induzieren. Auf diese Art und Weise können Tochtergeschwüre entstehen (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011; Bertram, 2000).

### 1.3. Der kanonische Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist eine über einen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor initiierte Signalkaskade und spielt in Säugetieren vor allem in der Embryogenese, z.B. während der Entwicklung des Primitivstreifens eine wichtige Rolle (McMahon and Moon, 1989; Dickinson and McMahon, 1992). In ausgereiften Organismen reguliert er häufig das adulte Stammzellschicksal (Clevers *et al.*, 2014), z.B. während der Fibrosierung älteren Muskelgewebes (Brack *et al.*, 2007) oder während Regenerations- und Wundheilungsprozessen (Stoick-Cooper *et al.*, 2007). Ferner ist er wichtig für Zellmigration und genetische Stabilität sowie für die Homöostase zwischen Proliferation und Apoptose (Dickinson and McMahon, 1992). Insgesamt hat der Wnt-Signalweg demzufolge ein sehr weites Funktionsspektrum und seine Deregulation ist mit diversen Erkrankungen, z.B. embryonalen Entwicklungsstörungen und Geburtsdefekten (Moon *et al.*, 2004; Reya and Clevers, 2005; Clevers, 2006) oder auch Krebserkrankungen, wie unter vielen anderen kolorektalen Karzinomen (Vider *et al.*, 1996) oder Tumoren der Speicheldrüsen (Queimado *et al.*, 2008) assoziiert.

Der Signalweg ist benannt nach seinen Liganden, den Wnt-Proteinen, wobei sich die Bezeichnung WNT aus Wg (*wingless*; *Drosophila melanogaster*) und Int-1 (*integration-1*; *Maus*) zusammensetzt. *Wingless* war das erste entdeckte Homolog zu Int-1 (Rijsewijk *et al.*, 1987), ein 1982 in viral induzierten Mammakarzinomen bei Mäusen identifiziertes Protoonkogen (Nusse and Varmus, 1982; Rijsewijk *et al.*, 1987). Evolutionsbiologisch betrachtet ist der Wnt-Signalweg stark konserviert. Schon vor 650 Millionen Jahren lebende multizelluläre Organismen trugen Wnt-Familien-Signalfaktoren in sich, die noch heute in Vertebraten zu finden sind (Kusserow *et al.*, 2005).

Der Wnt-Signalweg kann in drei verschiedene Signalkaskaden unterteilt werden. Es gibt den kanonischen  $\beta$ -Catenin-abhängigen und zwei nicht kanonische  $\beta$ -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege (Veeman *et al.*, 2003a). Dies kann jedoch nur als grobe Einteilung angesehen werden, da sehr viele Überschneidungen zwischen den verschiedenen Kaskaden existieren. Die Reaktion einer Zelle auf einen Wnt-Liganden und der daraufhin ablaufende Signalweg sind v.a. vom zellulären Kontext und der Kombination der jeweiligen Wnt-Liganden, Rezeptoren und Co-Rezeptoren abhängig (Niehrs, 2012; Veeman *et al.*, 2003a).

Die Liganden des Signalwegs, die Wnt-Proteine, sind sekretierte cysteinreiche Glykoproteine, die als Morphogene bzw. Wachstumsfaktoren wirken (Logan and Nusse, 2004; Nusse, 2008). Im Genom des *Homo sapiens* sind 19 verschiedene WNT-Gene bekannt. Ihre Rezeptoren zur Aktivierung der Signalkaskade sind die Frizzled-Rezeptoren (FZD), 7-Transmembranrezeptoren mit einer N-terminalen, cysteinreichen Extrazellulärdomäne, die der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) angehören und von denen 10 verschiedene Varianten bekannt sind. Als Co-Rezeptoren in Vertebraten fungieren die low-density lipoprotein receptor-related

proteins 5 und 6 (LRP5/6), die der Familie der LDL-Rezeptoren angehören (Nusse and Varmus, 1992; Clevers, 2006; Pinson *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000).

Einflüsse auf die Regulation sind durch diverse Inhibitoren, z.B. DKK1 (dickkopf-related protein 1), ZRNF3 (zinc and ring finger 3) bzw. dessen Homolog RNF43 (ring finger 43), aber auch durch Aktivatoren wie Norrin (norrie disease protein) und R-Spondine bekannt. Die Expression der Inhibitoren und Aktivatoren wird vor allem innerhalb der Signalkaskade durch negative bzw. positive Feedback-Schleifen reguliert, was die Sicherstellung einer exakten Feinabstimmung der Kaskade ermöglicht (Malinauskas and Jones, 2014; Niehrs, 2012; MacDonald *et al.*, 2009).

Das Schlüsselprotein und der wichtigste Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges ist jedoch  $\beta$ -Catenin, ein Protoonkoprotein, welches vom CTNNB1-Gen kodiert wird. Die Aktivität der Kaskade wird durch dessen Stabilisierung und Degradation maßgeblich beeinflusst. Es ist außerdem ein wichtiges Strukturprotein und spielt für Zellkontakte eine große Rolle.

Bei Abwesenheit von Wnt-Liganden und somit inaktivem Wnt-Signalweg liegt  $\beta$ -Catenin gekoppelt am sogenannten Destruktionskomplex vor. Dieser besteht aus den Proteinen Axin, adenomatosis polyposis coli (APC) und den beiden Serin-Threonin-Kinasen Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und Casein-Kinase 1 $\gamma$  (CK1 $\gamma$ ). GSK3 und CK1 $\gamma$  vermitteln dabei die Phosphorylierung an den N-terminalen Serin- bzw. Threonin-Resten des  $\beta$ -Catenins, wodurch es von der E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -TrCP (betatransducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase) erkannt, ubiquitiniert, für die proteasomale Degradation markiert und letztlich abgebaut wird. So wird die Menge an  $\beta$ -Catenin im Zytosol gering gehalten. Im Zellkern verhindert bei Inaktivität der Kaskade die Bindung des Transkriptionsrepressors Groucho an den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor (TCF) die Ablesung von Wnt-Zielgenen (Clevers, 2006; MacDonald *et al.*, 2009) (s. Abbildung 1 links).

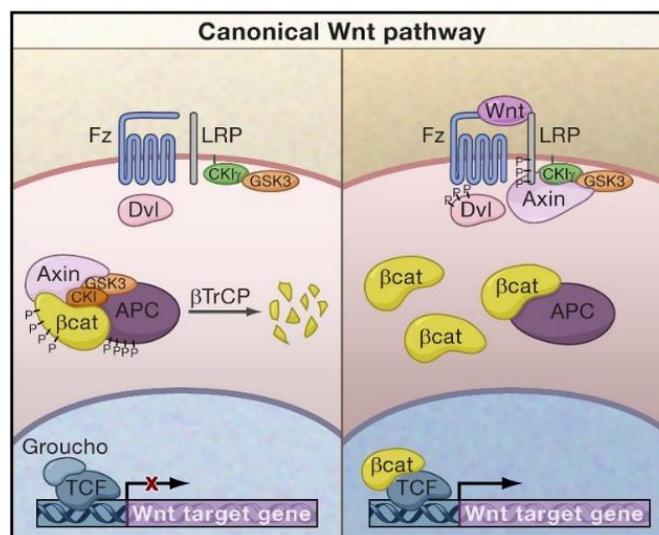


Abbildung 1: Kanonischer  $\beta$ -Catenin-abhängiger Wnt-Signalweg (Clevers, 2006)

Bei Anwesenheit eines Wnt-Liganden wird dieser vom Fzd/LRP5/6-Rezeptor-Komplex gebunden und es kommt in der Folge zu einer Akkumulation von stabilisiertem  $\beta$ -Catenin (s. Abbildung 1 rechts). Die molekularen Mechanismen in dieser Kaskade sind derzeit noch nicht vollständig geklärt, bekannt ist jedoch, kommt es zur Bindung eines Wnt-Liganden an den Fzd/LRP5/6-Rezeptor-Komplex, so folgt die Rekrutierung des dishevelled protein (Dvl) und es findet eine Interaktion mit Axin statt (Kishida *et al.*, 1999).

Daraufhin transloziert der Destruktionskomplex an die Zellmembran, was zur Konformationsänderung seiner Komponenten führt. In diesem Zustand ist dem Komplex die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und dessen Markierung für den proteasomalen Abbau nicht mehr möglich, was eine Anreicherung von stabilem  $\beta$ -Catenin im Zytosol zur Folge hat. Dieses stabilisierte  $\beta$ -Catenin wird anschließend in den Zellkern transportiert und ersetzt die Transkriptionsrepressoren der Groucho-Familie am TCF/LEF-Komplex. Es bildet sich ein  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF-Komplex, welcher die Transkription von Wnt-Zielgenen (Wnt-Targetgenen) aktiviert (Clevers, 2006; MacDonald *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; He *et al.*, 2004).

Derzeit sind artenübergreifend 125 Wnt-Targetgene (Wnt Target genes | The Wnt Homepage, 2022.000Z), Stand 05.07.22. Sie initiieren zelltyp- und gewebsspezifisch verschiedene Prozesse, wie Proliferation, Migration und auch terminale Differenzierung (Nusse, 2005; Clevers, 2006). Unter den bekannten Wnt-Zielgenen sind z.B. Proliferationsregulatoren, wie MYC, VEGF und CCND1, sowie die als Masterregulatoren der EMT (epithelial- mesenchymal transition) geltenden Gene TWIST und SNAIL1/2 (Kalluri and Weinberg, 2009).

Die EMT ist ein Prozess, der polarisierten Epithelzellen, die an der Basalmembran verankert sind, erlaubt, verschiedene biochemische Änderungen zu durchlaufen und einen mesenchymalen Phänotyp zu erlangen. Damit verbunden sind Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Migration, Invasion und Apoptoseresistenz, was letztendlich die Metastasierung eines Tumors ermöglicht (Kalluri and Neilson, 2003). Dass Twist und Snail1/2 Targetgene des Wnt-Signalwegs sind, spricht dafür, dass zwischen EMT und dem Wnt-Signalweg eine enge Verbindung besteht (Kalluri and Weinberg, 2009).

Auch die als Stammzellmarker beschriebenen Transkriptionsfaktoren Oct-3/4, Sox2 und Nanog gehören zu den kanonischen Wnt-Zielgenen, was für eine Verknüpfung zwischen Wnt-Signalweg und Erhaltung von Stammzeleigenschaften spricht (Reya and Clevers, 2005).

In Hinblick auf das breite Funktionsspektrum der Kaskade ist es naheliegend, dass eine Deregulation mit diversen Erkrankungen, darunter auch Tumorerkrankungen, assoziiert ist.

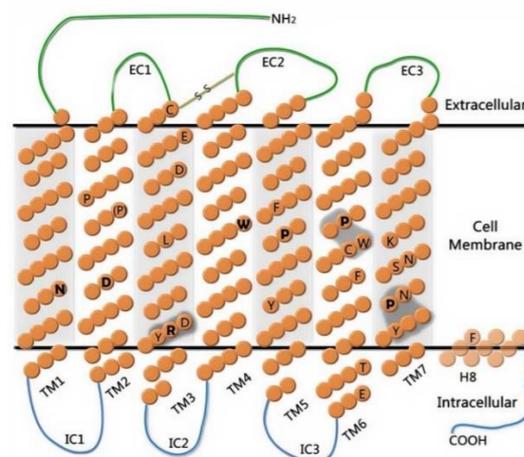
Bei Krebserkrankungen steht die Entwicklung und Progression eines Tumors häufig mit einer unkontrollierten Aktivierung des Wnt-Signalweges in Zusammenhang. Bedingt durch *loss of function* Mutationen von an der Kaskade beteiligten Tumorsuppressoren oder *gain of function* Mutationen in Protoonkogenen, kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs und Neoplasien sind die Folge (Polakis, 2012; Clevers and Nusse, 2012; MacDonald *et al.*, 2009).

Das hereditäre FAP-Syndrom (familiäre adenomatöse Polyposis coli) ist ein bekanntes Beispiel dafür. Hier kommt es bereits durch eine heterozygote *loss of function*-Keimbahnmutation des APC-Gens, infolge der daraufhin gestörten Funktion des Destruktionskomplexes, zu einer kontinuierlichen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Dies führt zur Bildung von kolorektalen Adenomen. Akkumuliert diese Mutation auch im zweiten Allel, ist der Übergang in kolorektale Karzinome die Folge (Clevers and Nusse, 2012). Eine Verbindung zwischen kolorektalen Karzinomen und dem Wnt-Signal-Weg wurde von der AG Clevers auch schon zuvor gezeigt (Bizen and Clevers, 2000).

Nach heutigem Kenntnisstand ist der Einfluss auf die Tumorerkrankung durch die Wnt-Signalweg-Aktivität jedoch sowohl gewebespezifisch, als auch tumorstadiumsabhängig und die aktive Kaskade kann die Progression einer Tumorerkrankung sowohl fördern als auch inhibieren (Anastas and Moon, 2013). Z.B. ist ein aktiver Wnt-Signalweg in Glioblastomen mit einer erhöhten Proliferation und einer verschlechterten Prognose (Kaur *et al.*, 2013) und in Melanomen mit verringerter Proliferation und einer besseren Prognose korreliert (Kageshita *et al.*, 2001; Maeklandsmo *et al.*, 2003).

#### 1.4. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, auch GPCR genannt, bilden mit über 800 kodierenden Gensequenzen die größte Proteinsuperfamilie der Membranrezeptoren im Menschen (Fredriksson *et al.*, 2003). Ihre Aktivierung erfolgt durch unterschiedlichste Stimuli. Diese reichen von Hormonen und Neurotransmittern über Photonen bis hin zu Geruchs- und Geschmacksstoffen (Kristiansen, 2004). Trotz ihrer Diversität in Funktion und Struktur verfügen alle Vertreter der GPCR-Familie über eine charakteristische 7-Transmembran-Domäne. Diese besteht aus sieben  $\alpha$ -Helices und ermöglicht die Verankerung in der Zellmembran.



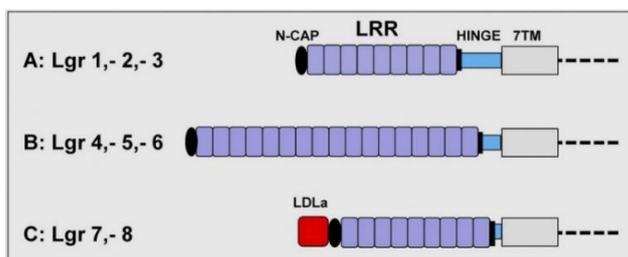
**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors und seinen 7-Transmembran-Domänen Bild (Trzaskowski *et al.*, 2012)

Die Helices sind durch unterschiedlich große Schleifen konnektiert, drei extrazelluläre (EC1-3) und drei intrazelluläre (IC1-3) (s. Abbildung 2). Die N-terminale Domäne liegt extrazellulär und ermöglicht die Ligandenbindung. Die C-terminale Domäne liegt auf der zytosolischen Seite und ist für die Interaktion mit den namensgebenden heterotrimeren G-Proteinen, aber auch mit Arrestinen, Kinasen oder anderen *down stream* Effektoren verantwortlich (Rassow *et al.*, 2012; Latek *et al.*, 2012).

Trotz der Identifikation der endogenen Liganden hunderter GPCRs sind für eine Vielzahl weder Ligand, noch genauer Wirkmechanismus bekannt, weshalb diese Rezeptoren Orphan GPCRs genannt werden.

Basierend auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit und Sequenzhomologien werden humane GPCRs im Wesentlichen in fünf Gruppen eingeteilt. Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsion-, Frizzled/Taste2- und Sekretinrezeptoren formen das GRAFS-Klassifikationssystem (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rhodopsin-Rezeptoren werden nochmals unterteilt in die Subklassen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  und  $\delta$ , wobei die GPCRs mit Leucin-reichen Wiederholungen (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors), die LGRs, der  $\delta$ -Subklasse angehören.

Unter den LGRs ist eine nochmalige Einteilung in die drei Unterklassen A, B und C möglich (van Hiel *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2013).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors 1-8 (Latek *et al.*, 2012)**

Gruppe A enthält die im Menschen vertretenen Glykoprotein-Hormonrezeptoren FSHR, LHCGR und TSHR, Gruppe C die Relaxin-Hormonrezeptoren LGR7 und LGR8.

LGR4, LGR5 und LGR6 gehören zur Unterklasse B und stehen durch ihre Stammzellmarker-Eigenschaften im Fokus der Forschung (siehe Abbildung 3).

Durch die übergreifende Beteiligung an diversen Prozessen im gesamten menschlichen Körper kann es im Falle von Dysregulationen in GPCR-vermittelten Signalwegen zu einer ebenso großen Anzahl von pathologischen Prozessen, u.a. auch Tumorprogression und Metastasierung kommen (Lappano and Maggiolini, 2012). Im Umkehrschluss bieten sich GPCR-regulierte Signaltransduktionswege als therapeutische Targets an, da sowohl die GPCR-Ligand-Interaktion als auch die beteiligten Regulatoren manipuliert werden können. Im Jahr 2018 hatten etwa 35% aller zugelassenen Medikamente G-Protein gekoppelte Rezeptoren zum Ziel (Sriram and Insel, 2018).

### 1.4.1. LGR5 – Aufbau, Funktion und klinische Relevanz

Das humane LGR5-Gen, auch bekannt als GPR49, GPR67, HG38 oder FEX hat eine Größe von ca. 144kb und liegt auf Chromosom 12 an Position 12q21.1 (NCBI). Es kodiert für einen 907 Aminosäuren großen Rezeptor (ca. 100kDa), den LGR5. Dieser umfasst wie alle Vertreter der GPCR-Familie eine 7-Transmembran-Domäne, sowie eine kurze C-terminale intrazelluläre Domäne und die für ihn charakteristische N-terminale Ektodomäne mit 17 Leucin-reichen Wiederholungen, von denen jede aus 20-25 Aminosäuren, flankiert von cysteinreichen Sequenzen, besteht (GeneCards Human Gene; McDonald *et al.*, 1998).

Derzeit sind drei alternative Spleißvarianten des LGR5 bekannt. Bei der Variante LGR5 Delta5 ist das Exon 5 (Rot *et al.*, 2011), bei der Variante LGR5 Delta8 das Exon 8 und bei der Variante LGR5 Delta5-8 sind die Exone 5-8 (Osawa *et al.*, 2016) alternativ herausgespleißt.

LGR5 wurde als Stammzellmarker intestinaler Zellen in der Basis der Krypten des Jejunum, Ileum und Colon, den sogenannten crypt base columnar cells, identifiziert (Barker *et al.*, 2007). In *in vitro*-Experimenten waren diese LGR5-positiven Zellen in der Lage, kryptenförmige Organoide auszubilden. Damit behielten sie auch außerhalb des Organismus Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Differenzierung in alle gewebeeigenen Zellarten bei (Sato *et al.*, 2009). Im weiteren Verlauf wurden LGR5-positive Stammzellen in einer Vielzahl verschiedener adulter Organe nachgewiesen. Eine Übersicht der gesunden Gewebe mit LGR5-positiven Stammzellen ist in Tabelle 1 dargestellt.

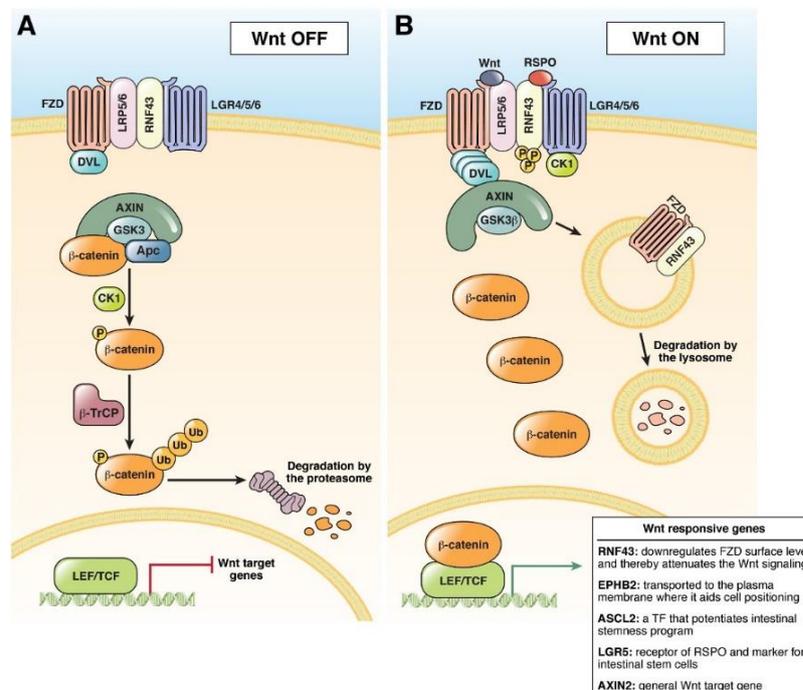
Tabelle 1: Gewebe mit nachgewiesenen LGR5-positiven Stammzellen, Auszug

Gewebe	Studie
Duodenum, Ileum, Jejunum und Colon	(Barker <i>et al.</i> , 2007)
Haut und Haarfollikel	(Jaks <i>et al.</i> , 2008)
Magen	(Barker and Clevers, 2010)
Innere Haarzellen	(Shi <i>et al.</i> , 2012)
Nieren	(Barker <i>et al.</i> , 2012)
Mamma	(Visser <i>et al.</i> , 2012; Plaks <i>et al.</i> , 2013)
Zunge, Geschmacksknospen, orale Mukosa	(Yee <i>et al.</i> , 2013; Boddupally <i>et al.</i> , 2016)
Pankreas	(Huch <i>et al.</i> , 2013b)
Leber	(Huch <i>et al.</i> , 2013a)
Ovar und Tube	(Ng <i>et al.</i> , 2014)
Hämatopoetisches System	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
Olfaktorisches Epithel	(M. Chen <i>et al.</i> , 2014)

LGR5 wurde als Target-Gen des Wnt-Signalwegs und als Bestandteil des Prozesses der Differenzierung humaner intestinaler Epithelzellen (van der Flier *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2009;

Lau *et al.*, 2011), sowie der Proliferation und Differenzierung vieler anderer Gewebe identifiziert. Die Bedeutung von LGR5 während der Embryogenese zeigten u.a. die 2004 durchgeführten LGR5-Knockout-Maus-Experimente, in denen eine homozygote LGR5-Mutation zu einer 100%igen neonatalen Letalitätsrate führte. Diese kam zustande durch Ankyloglossie, das Anwachsen der Zunge am Mundboden, und die daraus folgende Ausdehnung des Gastrointestinaltrakts durch Schlucken von Luft und Abwesenheit von Milch im Magen (Morita *et al.*, 2004).

Als exogene Liganden des LGR5-Rezeptors fungieren die Wnt-Agonisten R-Spondin-1-4. Es wurde gezeigt, dass LGR5, ebenso wie seine Homologen LGR4 und LGR6, über die Bindung der R-Spondine als Verstärker der Wnt-Kaskade wirkt (Carmon *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2011; Ruffner *et al.*, 2012; Glinka *et al.*, 2011). Damit ist LGR5 nicht nur Zielgen, sondern auch Regulator des Wnt-Signalweges. Der exakte Mechanismus der Signalübertragung ist noch nicht vollständig geklärt. Das derzeit allgemein anerkannte Modell postuliert einen Wirkmechanismus, bei dem die R-Spondine eine Bindung zwischen LGR5 und RNF43 (ring finger 43) bzw. LGR4 und ZRNF3 (zinc and ring finger 3) an der Zellmembran vermitteln. RNF43 und dessen Homolog ZRNF3 sind Transmembran-E3-Ubiquitin-Ligasen. Sie vermitteln die Ubiquitinierung und damit die Endozytose und Degradation der Wnt-Rezeptoren Fz und LRP5/6, was eine Herunterregulation des Signalweges zur Folge hat.



**Abbildung 4: R-Spondin- und LGR5-abhängige Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalweges**  
Abbildung (Koo and Clevers, 2014)

Eine R-Spondin-vermittelte Bindung zwischen LGR5 und RNF43, bzw. LGR4 und ZRN3, bewirkt die Entfernung der Ligasen von der Membranoberfläche. So wird der Abbau von Fz und

LRP5/6 verhindert und der Signalweg auf diese Weise verstärkt (Hao *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 2012; Fearon and Spence, 2012; Lau *et al.*, 2014) (s. Abbildung 5).

Die wichtigsten Komplexbildungen dabei konnten kristallografisch nachgewiesen werden: RSPO-LGR5 (Peng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), LGR5-RSPO-RNF43 (Chen *et al.*, 2013). Bedingt durch den beschriebenen LGR5-Wirkmechanismus hat eine Dysregulationen im LGR5-Signalweg unmittelbare Auswirkungen auf den Wnt-Signalweg (Lin *et al.*, 2015; Q. Chen *et al.*, 2014; Reya and Clevers, 2005). Ein Zusammenhang zwischen LGR5-Expression und Kanzerogenese wurde bereits in diversen Geweben festgestellt, u.a. in Kolon- und Ovarialkarzinomen (McClanahan *et al.*, 2006), Leberzellkarzinomen (Yamamoto *et al.*, 2003) oder auch in Präkanzerosen wie dem Barretösophagus (Becker *et al.*, 2008). LGR5-positive Zellen sind nicht mehr nur etablierte Stammzellmarker gesunder Gewebe, sondern können auch als Tumorstammzellmarker genutzt werden (Wu *et al.*, 2012; Nakata *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Zuletzt wurde LGR5 auch als Tumor-Stammzellmarker für Nasopharynxkarzinome gezeigt (Li *et al.*, 2020).

#### 1.4.2. LGR5-Expression in HNSCC

Für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich wurde bereits vor mehreren Jahren eine Verbindung zwischen erhöhter Wnt-Signalweg-Aktivität und verstärkter Metastasierung festgestellt (Song *et al.*, 2010). 2020 konnte in einer chinesischen Arbeitsgruppe bewiesen werden, dass in Nasopharynx-Karzinomzellen eine erhöhte LGR5-Expression zu einer erhöhten Expression von  $\beta$ -Catenin und damit zu einer verstärkten Wnt-Signalweg-Aktivierung und führte vice versa. Zudem ergaben die Studienergebnisse auch hier deutliche Hinweise darauf, dass eine erhöhte LGR5-Expression mit einer erhöhten Metastasierungsrate einhergeht (Li *et al.*, 2020).

Für das Mundhöhlenkarzinom untersuchte die AG Dalley 2015 die Relation zwischen LGR5-Expression und Schwere der Tumorerkrankung (Dalley *et al.*, 2015). Dafür wurden mehr als 300 Proben von gesundem Gewebe, präkanzerösen oralen epithelialen Dysplasien (OED) und oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) untersucht. Es zeigte sich, dass sich LGR5-positive Zellen in gesundem Gewebe auf das Stratum basale beschränkten, bei schwerer Dysplasie bis ins Stratum granulosum reichten und sich in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinom-Nestern dicht in ihren Rändern, jedoch nicht im Zentrum ansammelten. In schlecht differenzierten Tumoren waren die LGR5-positiven Zellen diffus verstreut zu beobachten. Im immunreaktiven Scoring, einer Quantifizierungsmöglichkeit zur Rezeptordichte in Tumorzellen, zeigte sich ein Anstieg in der LGR5-Dichte mit zunehmender Schwere der Erkrankung.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde eine signifikante Assoziation von erhöhtem mRNA-Expressionslevel der Spleißvariante LGR5 Delta5 und schlechterer Prognose in OSCC-Patienten festgestellt (Rot *et al.*, 2019). Hierzu wurden 78 Tumorproben von Patienten mit oralem

Plattenepithelkarzinom mithilfe von quantitativer real-time-PCR (qRT-PCR) auf ihr mRNA-Expressionslevel aller bekannten LGR5-Varianten (full-length, Delta5, Delta8, Delta5-8) jeweils einzeln untersucht und es stellte sich heraus, dass das mRNA-Level von LGR5 Delta5 ein unabhängiger negativer prognostischer Marker für OSCC-Patienten sowohl für das krankheitsspezifische Überleben als auch für die Metastasierung für die Patientenkohorte ist.

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte 2018, dass die LGR5-Expression in von ihnen untersuchten Gewebeproben von 190 Patienten mit HNSCC deutlich höher in maligne verändertem Gewebe war im Vergleich zu Normalgewebe. Die Expression war außerdem positiv korreliert mit Tumorgöße und TNM-Stadium. Zusätzlich zeigten Patienten mit LGR5-positiven Tumoren eine signifikant kürzere Überlebenszeit als Patienten mit LGR5-negativen Tumoren (Sabitha *et al.*, 2018).

## 1.5. Therapie von HNSCC

Die Therapie eines HNSCC ist, wie bei anderen Tumorformen, grundsätzlich abhängig von Lokalisation, Größe und T-Stadium des Primärtumors sowie N- und M-Stadium der Tumorerkrankung. Außerdem sind der Allgemeinzustand des Patienten, die behandlungsbedingte Morbidität mit ihren funktionellen und im Kopf-Hals-Bereich auch ästhetischen resultierenden Einschränkungen und der voraussichtliche Behandlungserfolg für die Therapiewahl von Bedeutung.

Die in den S3-Mundhöhlenkarzinom-Leitlinien von 2021 empfohlenen Therapien mit kurativer Intention umfassen die alleinige chirurgische Exzisionstherapie, die alleinige Strahlentherapie, eine Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemo- oder zielgerichteten Antikörpertherapie, sowie verschiedene Kombinationen von chirurgischer, Radio- und Chemo- oder Antikörpertherapie. In einer palliativen Therapiesituation wird die alleinige Chemotherapie auf Platinbasis, ggf. in Kombination mit einer zielgerichteten Antikörpertherapie empfohlen. Auch radiologische und chirurgische Maßnahmen können im Rahmen einer palliativen Therapie Anwendung finden (S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom).

Chirurgisch ist bei kurativ intendierter Therapie auf die Resektabilität des Tumors, funktionelle Einschränkungen als Konsequenz, den Allgemeinzustand und die Wünsche des Patienten zu achten. Häufig findet eine Resektion auch in Kombination mit direkter Rekonstruktion statt, insofern der Zustand des Patienten es zulässt und ermöglicht. Bei primär nicht realisierbarer R0-Resektion muss mit einer signifikant verschlechterten Prognose gerechnet werden und die gezielte Nachresektion wird empfohlen (S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom; Kovács, 2004; Hicks *et al.*, 1997; S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom).

Radiotherapeutisch ist die perkutane Bestrahlung oder in seltenen Fällen bei gut zugänglichen Tumoren mit niedrigem T-Stadium eine interstitielle Brachytherapie möglich (S3-Leitlinie

Mundhöhlenkarzinom).

Die Chemotherapie sollte im Falle einer neoadjuvanten Radiochemotherapie mit Cisplatin oder einer cisplatinhaltigen Kombination durchgeführt werden. Besonders bei Patienten unter 60 Jahren konnte ein Überlebensvorteil in der Kombination von Chemo- und Strahlentherapie im Gegensatz zu alleiniger Strahlentherapie gezeigt werden (Pignon *et al.*, 2000; Bourhis *et al.*, 2004).

### 1.5.1. Neue Therapieansätze

Zielgerichtete Therapien, sogenannte targeted therapies, nehmen in ihrer pharmazeutisch therapeutischen Bedeutung seit ca. zwei Jahrzehnten u.a. für Tumorerkrankungen stetig zu. Bei den zielgerichteten Therapeutika handelt es sich um Biologicals (Biologika). Darunter sind z.B. Antikörper, die sich gegen bestimmte Membranrezeptoren (z.B. Trastuzumab gegen den HER2-Rezeptor bei Mammakarzinom), Wachstumsfaktoren oder andere Proteine richten. Der Therapieansatz ist für Tumorerkrankungen v.a. darin begründet, dass bei Chemo- und Strahlentherapie auch stets umliegendes Gewebe geschädigt wird und die Therapie dadurch limitiert ist. Zielgerichtete Therapien sollen Tumorzellen spezifischer angreifen und den Gesamtorganismus schonen.

Speziell für HNSCC wird aktuell der EGFR-Antikörper Cetuximab als mögliche Alternative für Cisplatin während einer Radiochemotherapie bei einer kurativ intendierten Therapie in den Leitlinien empfohlen. Diese Empfehlung basiert u.a. auf einer randomisierten kontrollierten Studie, in der etwas mehr als 400 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom in zwei Gruppen randomisiert und jeweils isoliert bestrahlt oder einer Kombinationstherapie von Bestrahlung und Cetuximab unterzogen wurden. In den Ergebnissen zeigte sich, dass es bei Patienten, die zusätzlich Cetuximab erhielten, zu einer verbesserten lokalen Tumorkontrolle und reduzierter Mortalität ohne Verstärkungseffekt auf radiotherapeutische Nebenwirkungen kam, wie es bei paralleler Chemotherapie häufig der Fall ist (Bonner *et al.*, 2006).

Bei Rezidiv-Karzinomen oder metastasierten Tumorerkrankungen von HNSCC wird in den Leitlinien unter anderem die Gabe des PD-L1-Antikörpers Pembrolizumab empfohlen. 2019 konnte in einer Phase 3 Studie die Therapie mit Pembrolizumab in Kombination mit platinbasierter Chemotherapie und 5-Fluorouracil als geeignete Erstlinientherapie für PD-L1-negative metastasierte oder Rezidivkarzinome eines HNSCC und als Monotherapie für ebensolche mit positivem PD-L1-Status gezeigt werden (Burtneß *et al.*, 2019).

## 2. Zielstellung

Ein Zusammenhang zwischen einer LGR5-Expression und Auswirkungen auf die Entstehung, die Progression, das Therapieverhalten und die Prognose verschiedener Tumorerkrankungen ist bekannt (Q. Chen *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2013; McClanahan *et al.*, 2006; Nakata *et al.*, 2013; Osawa *et al.*, 2016; Rot *et al.*, 2019; Sabitha *et al.*, 2018) .

Für bösartige Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist die Bedeutung von LGR5 noch nicht vollständig geklärt. Bisher wurden positive Korrelationen zwischen dem LGR5-Expressionslevel auf Proteinebene und der Schwere der Erkrankung (Dalley *et al.*, 2015), sowie ein Zusammenhang zwischen dem LGR5 Delta5-Expressionslevel auf mRNA-Ebene und einer schlechteren Prognose von Patienten mit OSCC (Rot *et al.*, 2019) festgestellt. Die zelluläre Wirkungsweise von LGR5 ist dabei aber noch zu einem großen Teil unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität von zwei Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich mit veränderter LGR5-Expression nach Stimulation mit den Wnt-Agonisten Wnt3a und RSPO1 zu untersuchen.

Die erhobenen Ergebnisse sollen dazu beitragen, das Verständnis zur molekularen Wirkungsweise von LGR5 zu erweitern und perspektivisch als Grundlage und Orientierung für *in vivo*-Untersuchungen dienen. Es gilt herauszufinden, ob LGR5 sich als therapeutisches Target eignet und anhand des Rezeptorstatus definitive Aussagen über Prognose und Therapieauswahl gemacht werden können.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei HNSCC-Tumor-Zelllinien verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Tumorzelllinien

Zelllinie	Ursprung	Spezies	Lokalisation	Referenzen
Cal33	Plattenepithelkarzinom	<i>Homo sapiens</i>	Zunge	DSMZ:ACC447 (Gioanni <i>et al.</i> , 1988)
FaDu	Plattenepithelkarzinom	<i>Homo sapiens</i>	Hypopharynx	HTB-43 (ATCC) (Rangan, 1972)

Außerdem wurden bereits vor Beginn des experimentellen Arbeitens gentechnisch veränderte Kulturen beider Zelllinien mit einem veränderten Expressionslevel (Überexpression bzw. Knockdown) von LGR5 full-length und der Spleißvariante LGR5 Delta5 von der Arbeitsgruppe etabliert.

Diese Zellkulturen wurden durch lentivirale Transduktion erzeugt. Für die Überexpression von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 wurden Vektoren mit den kodierenden Sequenzen von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 transduziert. Für den Knockdown aller LGR5-Varianten wurde gegen beide LGR5-Varianten gerichtete shRNA genutzt. Als Kontrolle der Überexpressionen wurde der Leervektor pLVX verwendet. Als Kontrolle des Knockdowns diente eine non-target shRNA, welche keine Zielsequenz im menschlichen Genom hat. Durch die lentivirale Transduktion wurden die Elemente (Vektoren bzw. shRNA) in das Genom der Zielzellen integriert, was zu einer stabilen gentechnischen Veränderung der Zellen führte. Im Weiteren werden übersichtshalber die auf diese Weise veränderten Zellen als verschiedene LGR5-Modulationen bzw. Zellen mit veränderter LGR5-Expression bezeichnet.

Tabelle 3: LGR5-Modulationen

Zelllinie	Gentechnische Veränderung	Vektor	Modulation
FaDu	pLVX	pLVX Leervektor	
FaDu	LGR5	pLVX LGR5 full-length	Überexpression LGR5 full-length
FaDu	LGR5 Delta5	pLVX LGR5D5	Überexpression LGR5 Delta5
FaDu	86L	pLKO1 shRNA 86L	Knockdown aller LGR5-Varianten
FaDu	nTL	pLKO1 non-target shRNA	
Cal33	pLVX	pLVX Leervektor	
Cal33	LGR5	pLVX LGR5 full-length	Überexpression LGR5 full-length

Cal33	LGR5 Delta5	pLVX LGR5D5	Überexpression LGR5 Delta5
Cal33	86L	pLKO1 shRNA 86L	Knockdown aller LGR5-Varianten
Cal33	nTL	pLKO1 non-target shRNA	

### 3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

#### (1) Zellkultur

Fetales Kälberserum (FBS, South American) - Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

Ethanol 95% - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

PBS (Isoton II Diluent) - Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Penicillin/Streptomycin - Biochrom (Berlin) (10.000 U/mL bzw. 10.000 µg/mL)

Pyruvat - Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA)

RPMI 1640 Biowhittaker - Lonza (Basel, Schweiz)

RPMI 1640 Gibco L-Glutamine - Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Trypsin - Biochrom (Berlin)

#### (2) TOP-Flash/ FOP-Flash:

Accutase - Biowest TH Geyer (Renningen)

Dual-Glo Luciferase Assay System- Promega (Mannheim)

RSPO1 (rekombinant, human) - Bio-Techne (Minneapolis, MN, USA)

Vektor M50 Super 8x TOPFlash - Addgene (Watertown, MA, USA, #12456)

Vektor M51 Super 8xFOPFlash - Addgene (Watertown, MA, USA, #12457)

Vektor pGL4.74 [hRluc/TK] - Promega (Mannheim)

ViaFect™ Transfektionsreagenz - Promega (Mannheim)

Wnt-3a (rekombinant, human) - Bio-Techne (Minneapolis, MN, USA)

#### (3) Koloniebildungstest:

Cis-Diammineplatinum(II) dichloride - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), #P4394-100MG

DMSO (Dimethylsulfoxid) - PanReac AppliChem (Darmstadt)

Formalin (37%) - Roth (Karlsruhe)

Giemsa-Lösung - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Wnt3a und RSPO1 - Bio-Techne (Minneapolis, MN, USA)

#### (4) Mikrobiologische Methoden

*RNA-Isolation:*

ZR RNA MiniPrep™-Kit (95% Ethanol, RNA Wash Buffer, RNA Lysis Buffer,

RNA Prep Buffer

Dnase/ Rnase-freies Wasser) - Zymo Research (Irvine, CA, USA)

*cDNA-Synthese:*

Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit

(random Primer, 5x Puffer, RiboLock Rnase, Inhibitor (20 u/μL), dNTPmix, RevertAid H Minus, M- MuLV Reverse Transkriptase) - Thermofischer Scientific (Waltheim, MA, USA)

*qRT-PCR:*

TaqMan® Gene Expression Assays - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

TaqMan® Gene Expression Master Mix - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 4: Taqman-Sonden

Gen	Sondenbezeichnung
ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1)	Hs00184500_m1 FAM
CLCA2 (chloride channel accessory 2)	Hs00998916_m1 FAM
E-CAD (E-Cadherin)	Hs01023894_m1 FAM
LGR4	Hs00173908_m1 FAM
LGR6	Hs00663887_m1 FAM
RNF43 (ring finger protein 43)	Hs00214886_m1 FAM
RPL9 (ribosomal protein L9)	Hs01552541_g1 VIC
VIM (Vimentin)	Hs00185584_m1 FAM
WNT 3a (Wnt family member 3a)	Hs00263977_m1 FAM
ZNRF3 (zinc and ring finger 3)	Hs00393094_m1 FAM

Tabelle 5: Biozymsonden für LGR5 full-length und LGR5 Delta5

	Primer	Sequenz 5'→3'	Orientierung	Lokalisation bp	
<b>277</b>	LGR5D5-8 727 fw	GCCTTCA- ATCCCTACATTTC	sense	727	NM_003667.3
<b>278</b>	LGR5 932 fw	AAACCTCTCCAG- CTTGGTAG	sense	932	NM_003667.3
<b>279</b>	LGR5 1124 rev	CGACCTGATATT- GTTGCTAT- GAAATC	antisense	1124	NM_003667.3
	LGR5D5 probe 767	5'-FAM-CCTGG- GAAAGAAAT- GCTTTGATGGGC- BHQ1-3'	sense	767	NM_001277227.1

(5) Proteinbiologische Methoden (Westernblot)

4xLämmli-Puffer -BioRAD (Hercules, CA, USA)  
 BSA (bovines Serumalbumin) - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)  
 Complete Protease-Inhibitor Cocktail - Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz)  
 Glycerin - Roth (Karlsruhe)  
 Isopropanol - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)  
 LDS-Sample Buffer und Reducing Agent - Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)  
 Magermilchpulver - Roth (Karlsruhe)  
 Phosphataseinhibitor Mix I (100x Stock,Serva 39050) - Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)  
 PMSF (5g; Serva 32395) - Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)  
 RIPA-Puffer:  
 50mM Tris-HCL pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Natrium-Deoxycholsäure, 1% Triton X-100 + frisch zusetzen: Protease Inhibitor, PMSF (200mM Stock), Glycerol Cell Signaling Technology - (Danvers, MA, USA)  
 SDS - Serva (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 6: Primäre Antikörper

GPR49 (LGR5) Rabbit Monoclonal Ab #2495-1 Abcam ID: ab75850	Epitomics (Burlingame, CA, USA)
β-Actin Mouse Ab #A5441	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Polyclonal Goat Anti-Rabbit Ig HRP Ab P0448	Dako Denmark Glostrup (Dänemark)
Anti-mouse IgG HRP-linked Ab #7076S	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

3.1.3. Geräte und Verbrauchsmittel

Alle Materialien, die in der Zellkultur verwendet wurden, wie Einmalpipetten (5ml-50ml), Greiner-Röhrchen (15ml und 50ml), sowie Gewebekulturflaschen in verschiedenen Größen, wurden von Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) bezogen. Sterile Reaktionsgefäße, Pipetten (0,5-1000µl) und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen stammten von Eppendorf (Hamburg). Die im TOPFlash verwendeten 96-Well Zellkulturplatten wurden von Merck (Darmstadt) bezogen, die im Koloniebildungstest genutzten 6-Well Zellkulturplatten von TPP (Trasadingen, Schweiz). Der Parafilm für die Abdeckung der 6-Well Zellkulturplatten stammte

von Pechiney Plastic Packaging (Menasha, Wisconsin, USA).

Zum Eigenschutz wurden Nitra-Tex Labor-Nitril-Untersuchungshandschuhe (Ansell, Yarra City, Australien) und Mundschutzmasken (Kimberly-Clark, Irving, Texas, USA) verwendet.

Außerdem wurden folgende Geräte genutzt:

CO<sub>2</sub>-Inkubator HeraCell - Heraeus Group (Hanau)

Linearbeschleuniger "Oncor Impression IMRT" - Siemens (München)

Mikroskop Axiovert 25 - Zeiss (Oberkochen)

Pipetboy 2 - Integra Biosciences (Biebertal)

Plattenreader GENios - Tecan Group (Männedorf, Schweiz)

RT-qPCR-Cycler Rotorgene 6000 Corbett - Life Science (Merck-Group, Darmstadt)

Scientific Industries SI™ Vortex Genie™ 2 - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Spektrophotometer NanoDrop 2000c - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD 2070 - Bandelin (Berlin)

Zellzählgerät Z2 - Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

Zentrifuge Universal 320R -Hettich (Tuttlingen)

## 3.2. Methodik

### 3.2.1. Zellbiologische Methoden

Alle im fortlaufenden beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar-Flow-Box/Sicherheitswerkbank) in entsprechenden S1-, bzw. S2-Labor-Räumen der Arbeitsgruppe durchgeführt.

#### (1) Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit der gefrorenen Zellsuspension wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C bis zur Verflüssigung erwärmt. Pro Röhrchen wurde ein 15 ml Greiner Röhrchen mit ca. 5 ml Medium vorbereitet, in das die aufgetaute Zellsuspension überführt wurde. Die Zellsuspension wurde für 4 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellett in 1-2 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> große Gewebekulturflasche mit vorgelegten 2 ml Vollmedium und 1 ml FKS überführt. Nach ausreichender Verteilung mittels achtförmigen Schwenkens wurde nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, maximaler Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> das Medium gewechselt.

#### (2) Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen

Die Zelllinien Cal33 und FaDu wurden in sterilen Gewebekulturflaschen mit Filterschraubdeckel bei 37 °C, maximaler Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 Medium mit

Zusatz von 2% Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin), 10% fetalem Kälberserum und 1% Pyruvat (Vollmedium) kultiviert. Je nach Zelldichte wurde das Medium alle ein bis drei Tage gewechselt. War der Flaschenboden zu 80-90% mit Zellen bewachsen, wurden diese passagiert. Dabei wurde zunächst der Überstand abgesaugt, die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen und anschließend für ca. 5 min bei 37 °C mit 20%igem Trypsin inkubiert. Dieser Vorgang führte zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden. Im Verlauf des TOPFlash- Assays wurde zum Ablösen der Zellen Accutase verwendet, um eine schonendere Ablösung vom Flaschenboden und den Erhalt möglichst vieler Oberflächenrezeptoren zu gewährleisten, wobei eine Inkubationszeit von ca. 10 Minuten nötig war. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch Zugabe von etwa der doppelten Menge Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 4 min bei 800 rpm pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde, je nach Pellettgröße, in 1-3 ml Medium aufgenommen. Die Suspension wurde, je nach Bedarf, vollständig oder teilweise in eine neue mit Vollmedium gefüllte Gewebekulturflasche überführt. Zum Einstreuen einer definierten Zellzahl wurde die Zellzahl bestimmt (s. 3.2.1. (4)). Um eine optimale Verteilung der Zellen zu erreichen, wurden die Flaschen anschließend achtförmig geschwenkt.

### (3) Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie beim Vorgang des Passagierens vom Überstand befreit, mit DPBS gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Währenddessen wurde die benötigte Menge Einfriermedium aus 40% Vollmedium, 40% FKS und 20% DMSO in einem 50 ml Falconröhrchen hergestellt.

Das jeweils entstandene Pellet jeder Zelllinie wurde nach Absaugen des Überstands in 1 ml Vollmedium resuspendiert, mit weiteren 2-3 ml, je nach Pellettgröße, aufgefüllt und die Zellzahl bestimmt. Es folgte eine weitere Zentrifugation, nach der das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend bis zur gewünschten Verdünnung (2-3 Mio. Zellen pro 1,8 ml) mit Einfriermedium aufgefüllt wurde. In die zuvor mit Name, Passage und Datum beschrifteten 2 ml Kryoröhrchen wurden nun jeweils 1,8 ml der Zellsuspension eingefüllt. Anschließend wurden alle Kryoröhrchen in einem doppelwandigen mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter platziert und für 24 h bei -80 °C gelagert. Das Isopropanol in der Wand des Behälters sorgte für ein schonendes Einfrieren mit einer maximalen Temperatursenkung von einem Grad pro Minute. Eine kurzfristige Lagerung bis zu mehreren Wochen war bei -80 °C möglich, die langfristige Lagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff.

### (4) Zellzahlbestimmung

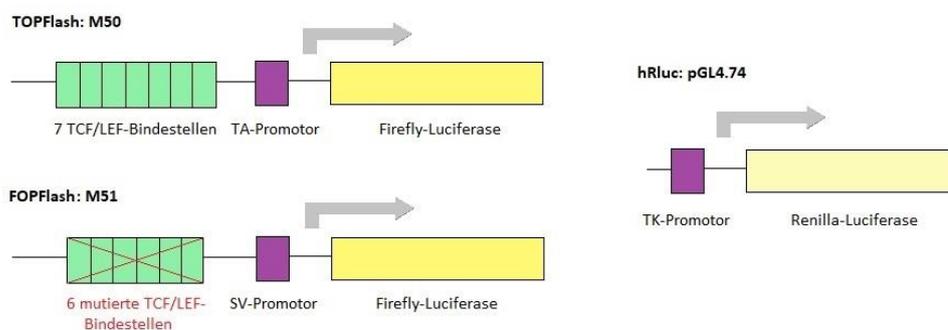
Die Zellzahl wurde mit dem Zellzählgerät Z1/Z2 von Beckman-Coulter bestimmt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10 ml Isoton-Lösung aufgefüllt, um eine 1:100-Verdünnung

herzustellen. Der Zählbecher wurde im Gerät platziert und es erfolgte die Messung, wobei das Zellzählgerät alle Partikel mit einem Durchmesser zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 37  $\mu\text{M}$  erfasste. Anhand eines programmierten Verdünnungsfaktors berechnete das Gerät die Konzentration der Ausgangssuspension und gab diese in Zellzahl pro Milliliter aus.

### (5) TOPFlash/FOPFlash Assay

Der TOPFlash-Assay ist ein Reporter Assay (Veeman *et al.*, 2003b) und ermöglicht durch Messung eines Lumineszenzsignals die Quantifizierung der Aktivität des  $\beta$ -Catenin-vermittelten Wnt-Signalweges. Das Lumineszenzsignal entsteht nach Substratzugabe durch die transkriptionelle Wirkung des Transkriptionsfaktors TCF/LEF auf den Promotor (TATA Box des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Promotors) mit nachgeschaltetem Firefly-Luciferase-Gen (s. Abbildung 6). Die Firefly-Luciferase katalysiert sauerstoffabhängig und unter ATP-Verbrauch die Decarboxylierung von Luciferin, was zu einer messbaren Lichtemission führt. Das Firefly-Luciferase-Gen steht dabei unter der Kontrolle des TA-Promotors sowie der sieben nativen TCF/LEF-Bindestellen im TOPFlash, bzw. des SV-Promotors (Simian Virus 40 Promotor) und der sechs mutierten TCF/LEF-Bindestellen im FOPFlash.

Bei erhöhter Aktivität des Wnt-Signalweges stabilisiert sich das zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin, was zu einer erhöhten Expression des durch ihn induzierbaren Reporters Firefly-Luciferase und somit einer höheren Biolumineszenz führt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vektoren im TOPFlash/FOPFlash Reporter Assay**  
Abbildung angelehnt an (Rot, 2017)

Dargestellt ist jeweils die Expressionskassette des TOPFlash bzw. FOPFlash-Vektors. Im TOPFlash-Vektor M50 steht das Firefly-Luciferase-Gen unter Kontrolle eines TA-Promotors, wobei diesem sieben native TCF/LEF-Bindestellen vorgeschaltet sind. Im FOPFlash-Vektor M51, welcher als Background-Abgleich fungiert, sind dem SV-Promotor sechs mutierte TCF/LEF-Bindestellen vorgeschaltet. Für die Visualisierung der Transfektionseffizienz wird der hRluc-Vektor genutzt, der das Renilla-Luciferase-Gen mit dem vorgeschalteten TK-Promotor beinhaltet.

Im FOPFlash wird die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch die mutierten TCF/LEF-Bindestellen verhindert, wodurch dieser als Background-Abgleich genutzt werden kann. Als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz beider Reaktionen dient der Renilla-Luciferase-Vektor pGL4.74, wobei die Renilla-Luciferase konstitutiv exprimiert wird (Minimal-Promotor TK) und ihr Lumineszenzsignal in einer nachgeschalteten Messung quantifiziert werden kann.

Für den TOPFlash-Assay wurden je Zelllinie 30 000 Zellen pro Well in 96-Well Platten in Vollmedium eingestreut und 24 h kultiviert. Im Anschluss folgte die Transfektion mittels Viafect™ Transfektionsreagenz. Der Transfektionsansatz wurde wie folgt pipettiert (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Transfektionsmix TOPFlash/FOPFlash-Assay

1x Reaktion	10µL Gesamtvolumen
90 ng TOPFlash M50 bzw. FOPFlash Vektor M51	x µl
10 ng hRluc Vektor	y µl
RPMI-Medium (serumfrei)	z µl
ViaFect™ Transfektionsreagenz	0,4 µl

Im Transfektionsmix TOPFlash wurden der Vektor M50, der Vektor hRluc und serumfreies Medium in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt und gevortext. Anschließend wurde Viafect™ Transfektionsreagenz (Promega) hinzugegeben, noch einmal gevortext und alles bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Im FOPFlash wurde der Vektor M51 anstelle von M50 verwendet. Das Medium über den Zellen wurde abgesaugt und durch 90 µl frisches Vollmedium ersetzt. Pro Well wurden 10 µl Transfektionsmix appliziert und für acht Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf von acht Stunden wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und es erfolgte die Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in verschiedenen Konzentrationen (s. Tabelle 9) in 100 µl frischem RPMI-Medium mit 1% FKS-Anteil pro Well.

Tabelle 9: Stimulationskonzentrationen Wnt3a und RSPO1

Wnt3a Konzentration in ng/ml	0	10	10	10	15	15	15	25	25	25
RSPO1 Konzentration in ng/ml	0	10	15	25	10	15	25	10	15	25

Nach Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 16 Stunden erfolgte die Lumineszenzmessung mittels Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) nach Angaben des Herstellers im Plattenreader GENios von Tecan.

Für beide Zelllinien wurden je fünf unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen jede Probe jeweils als Triplet vermessen wurde.

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2013. Zunächst wurden die Firefly-Luciferase-Messwerte des TOPFlashs bzw. FOPFlashs mit entsprechenden Messwerte der Renilla-Luciferase normalisiert, wodurch der Einfluss der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen im jeweiligen Well herausgerechnet wurde.

Anschließend wurde der *ratio* gebildet, indem die auf die Renilla-Werte normalisierten TOPFlash-Werte durch die entsprechenden normalisierten FOPFlash-Werte geteilt wurden. Der

*ratio* ermöglicht eine quantitative Aussage über die Höhe der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität und damit über die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges.

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

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

Der TOPFlash-Reporter-Assay in dieser Arbeit diente zur Auswahl einer Konzentration von Wnt3a und einer Konzentration von RSPO1, bei der in beiden Zelllinien eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalweges stattfindet. Diese Auswahl erfolgte anhand der gemittelten Ergebnisse.

#### (6) Zellkoloniebildungstest

Der Zellkoloniebildungstest oder auch Kolonieformationsassay gilt als Goldstandard, um die klonogene Überlebensrate nach einer Behandlung zu analysieren. Zur Durchführung wurden die Zellen nach der entsprechenden Behandlung durch Trypsininkubation vom Kulturflaschenboden abgelöst und vier Minuten bei 800 rpm sedimentiert. Das dabei erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden nun definiert (50–16000 Zellen in Abhängigkeit von Zelllinie, LGR5-Modulation und Behandlung) in 6 Well Platten eingestreut. Je Platte wurden drei verschiedene Zellzahlen als Doppelbestimmung eingestreut. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 10-14 Tage kultiviert. Nach Ablauf der Wachstumsperiode wurden alle Koloniebildungstests abgestoppt, indem zunächst das Medium abgegossen und die Zellen mittels 20 minütiger Inkubation mit 3,7%iger Formalinlösung bei Raumtemperatur fixiert wurden. Anschließend wurden das Formalin entfernt und die Kolonien mit monodestilliertem Wasser vorsichtig gewaschen. Es folgte die Färbung mittels Giemsa-Lösung, die in einem Verhältnis von 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt wurde, für ca. 20 min. Abschließend wurden die Kolonien mit monodestilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Ausgezählt wurde jede makroskopisch sichtbare Kolonie mit einer Größe von mindestens 50 Zellen.

$$\text{Absolute Plattiereffizienz} = \frac{\text{Kolonienzahl ausgezählt}}{\text{Zellzahl eingestreut}}$$

$$\text{Relative Plattiereffizienz} = \frac{\text{Mw absolute PE Behandlung}}{\text{Mw absolute PE Kontrolle}} * 100$$

Die absolute Plattiereffizienz wurde berechnet, indem die Anzahl der gezählten Kolonien durch die Anzahl der eingestreuten Zellen dividiert wurde. Die relative Plattiereffizienz, also die

klonogene Überlebensrate, wurde bestimmt, indem der Mittelwert der absoluten Plattiereffizienz einer Cisplatin-Behandlung jeweils auf den Mittelwert der absoluten Plattiereffizienz der unbehandelten Kontrolle relativiert wurde.

#### (7) Bestimmung des IC50-Wertes für Cisplatin mittels Koloniebildungstest

Die Bestimmung der Konzentrationen von Cisplatin, bei denen das klonogene Überleben der Zelllinien Cal33 und FaDu um 50% sinkt, erfolgte mittels Zellkoloniebildungstest folgendermaßen.

Eine definierte Zellzahl (s. 3.2.1 (4)) von 400.000 Zellen wurde je Zelllinie in acht Zellkulturflaschen (25cm<sup>2</sup>) in Vollmedium eingestreut. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgten ein Mediumswechsel und die Behandlung mit Cisplatin. Das Cisplatin wurde in einer Konzentration von 25 mM in DMF gelöst (Stammlösung) bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Für die Behandlung wurde Cisplatin zunächst in serumfreiem Medium auf 500µM vorverdünnt (Arbeitslösung) und anschließend in der entsprechenden Menge in Vollmedium mit reduziertem FKS-Anteil (5%) gegeben. Die angewendeten Cisplatinkonzentrationen betragen zu Beginn 0,1-20µM. Nach mehreren Vorversuchen wurden sieben Konzentrationen ausgewählt, um den IC50-Wert zu bestimmen (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Cisplatin-Konzentrationen zur IC50-Bestimmung

Cisplatin-Konzentration [µM]	
Cal33	0 1,0 2,0 3,0 4,0 4,5 5,0 5,5
FaDu	0 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 3,5

Die Inkubation mit Cisplatin erfolgte für 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, mit PBS gewaschen und zu Standardkultivierungsbedingungen mit Vollmedium in 6 Well Zellkulturplatten (TPP) eingestreut. Die hier genutzten Zellzahlen (drei verschiedene je Platte) wurden über die Vorversuche hinweg angepasst und auf die Hauptversuchsreihe übertragen. Die Inkubation erfolgte für 10 Tage. Nach Ablauf der Wachstumsperiode wurde der Zellkoloniebildungstest wie in 3.2.1.(6) beschrieben abgestoppt und die relative Plattiereffizienz bestimmt.

In jeder Zelllinie wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Bestimmung der IC50-Werte erfolgte mittels Origin Pro 18b unter Nutzung der Funktion ExpDec Fit1.

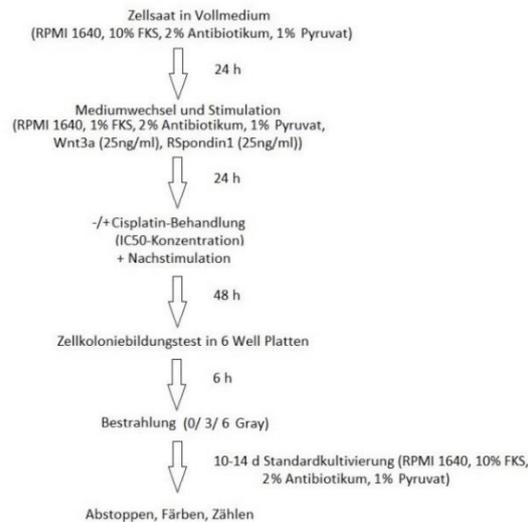
#### (8) Zellkoloniebildungstest mit Stimulation, Cisplatinbehandlung und Bestrahlung

Die Untersuchung des strahlenbiologischen Verhaltens und der Chemosensitivität der beiden zu untersuchenden Zelllinien erfolgte mittels Zellkoloniebildungstest (s. Abbildung 7).

Für jede zu untersuchende LGR5-Modulation wurden 300.000 Zellen in je zwei 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in Vollmedium eingestreut. Für die Leervektorkontrolle pLVX wurden vier

Flaschen vorbereitet, um zusätzlich eine unstimulierte Kontrolle mitzuführen.

Nach 24 Stunden erfolgten ein Mediumswechsel und die Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in 25 ng/ml- Konzentrationen, welche im TOPFlash-Assay in Vorversuchen bestimmt wurden, um eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu induzieren. Das hier genutzte Medium enthielt 1% FKS.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung zum Ablauf des Koloniebildungstests**

Nach 24 stündiger Inkubation wurde jeweils eine der zwei eingestreuten Flaschen mit 1 ml Cisplatin-haltigem Medium behandelt. Die Cisplatin-Stammlösung wurde dabei in serumfreiem Medium vorverdünnt (Arbeitslösung) und anschließend die entsprechenden Volumina der Vorverdünnung in Kulturmedium mit einem reduzierten FKS-Anteil (1%) pipettiert. Für die Cisplatin-Behandlung wurde der zuvor bestimmte IC50-Wert als Konzentration genutzt. In der Zelllinie Cal33 wurde mit einer Cisplatin-Konzentration von 1,3  $\mu\text{M}$  gearbeitet und für die Zelllinie FaDu wurde eine Konzentration von 0,58  $\mu\text{M}$  angewendet. Die jeweilige unbehandelte Kontrolle erhielt DMF in 1%igem Medium. Außerdem wurde zusätzlich jeweils so viel Wnt3a und RSPO1 hinzugefügt, um die korrekte Stimulationskonzentration im neuen Volumen aufrechtzuerhalten. Bei der mitgeführten unstimulierten pLVX-Kontrolle wurde ebenso viel serumfreies Medium ohne Stimulation hinzugesetzt. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden aus jeder für den Versuch vorbereiteten Flasche drei Koloniebildungstests (unterschiedliche Bestrahlungsdosen) eingestreut und sechs Stunden im Brutschrank inkubiert (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Versuchsaufbau

	pLVX stimuliert	pLVX unstimuliert	LGR5	Delta5	nTL	86L
Wnt3a [ng/ml]	25	0	25	25	25	25
RSPO1 [ng/ml]	25	0	25	25	25	25

Cisplatin-Behandlung	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bestrahlungsdosis [Gy]	0/3/ 6	0/3/6	0/3/ 6									

Im Anschluss erfolgte die Bestrahlung der eingestreuten Kolonietests. Dafür wurden alle Platten in einer Styroporbox in die Universitätsklinik für Strahlentherapie transportiert und dort mit 3 bzw. 6Gy am Linearbeschleuniger (Modell ‚Oncor Impression IMRT‘ der Marke Siemens) bestrahlt. Der Bestrahlungszeitpunkt wurde so gewählt, dass sich alle Zellen in den Platten sicher abgesetzt haben, sich aber dennoch noch vor der ersten Zellteilung nach Anwachsen befinden. Auch die nicht zu bestrahlenden Platten wurden in die Strahlenklinik mitgeführt, um die Versuchsbedingungen für alle Zellen identisch zu halten. Die anschließende Wachstumsperiode im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> betrug für alle Koloniebildungstests mindestens 10 Tage. Anschließend wurde der Zellkoloniebildungstest wie in 3.2.1.(6) beschrieben abgestoppt und die absolute und die relative Plattiereffizienz bestimmt.

In beiden Zelllinien wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

$$\text{Absolute Plattiereffizienz} = \frac{\text{Kolonienzahl ausgezählt}}{\text{Zellzahl eingestreut}}$$

$$\text{Relative Plattiereffizienz} = \frac{\text{Mw absolute PE 3Gy bzw. 6Gy}}{\text{Mw absolute PE 0Gy}} * 100$$

In der Strahlenbiologie wird die relative Plattiereffizienz auch als survival fraction (SF<sub>n</sub>) für eine spezifische Strahlendosis (n) bezeichnet und gibt das klonogene Überleben, d.h. die Zahl der noch teilungsfähigen Zellen, in Prozent an. Die Auswertung und Darstellung in Diagrammen erfolgte mittels Excel (Microsoft Office 2013) und Origin Pro 18b.

### 3.2.2. Molekulare Methoden

#### (1) RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des ZR RNA MiniPrep™ Kits von Zymo Research, bis auf das Auslassen des Schrittes des DNase-Verdaus, nach Angaben des Herstellers.

Die Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäure erfolgte mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Hierbei wurde RNase-freies Wasser als Blank genutzt und jeweils 2 µl jeder Probe aufgetragen. Die Messung erfolgte bei 260 nm/280 nm und die Ausgabe der Konzentration in ng/ml.

## (2) cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die reverse Transkription, die Umschreibung von mRNA in cDNA, wird ermöglicht durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und random hexamer-Primer oder Oligo-dT Primer. In dieser Arbeit erfolgte die cDNA-Synthese mithilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits von Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 20 µl eines Hybridisierungsansatzes nach dem folgenden Schema auf Eis hergestellt.

### *RNA-Ansatz:*

x µl H <sub>2</sub> O	
1 µl random primer	
y µl RNA (1 µg)	
12 µl Ansatz	

### *Mastermix:*

4 µl 5x Puffer	
1 µl RiboLock RNase-Inhibitor	
2 µl dNTPMix (10 mM)	
1 µl RevertAid H Minus M-MuLV	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	
8 µl Mastermix	

Der RNA-Ansatz wurde gevortext, für 5 min bei 65°C im Mastercycler Gradient (Eppendorf) inkubiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde dem RNA-Ansatz 8 µl Mastermix hinzugefügt, um den Reaktionsmix zu erhalten. Dieser wurde gut vermischt, kurz zentrifugiert und im Mastercycler Gradient (Eppendorf) platziert. Das Primer annealing erfolgte für 25min bei 25°C, die cDNA-Synthese für 60min bei 42°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte für kurze Zeit bei -18°C.

## (3) PCR

### Polymerase-Kettenreaktion mittels Taq-Polymerase:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, wobei die zu vervielfältigenden Sequenzen als Einzel- oder als Doppelstrang-DNA vorliegen können.

Zusätzlich zur Taq-Polymerase werden zwei Primer und einzelne Nukleosidtriphosphate benötigt. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt und setzt sich für gewöhnlich aus folgenden Schritten zusammen: (1) die Denaturierung bei 95°C, (2) das Annealing oder auch die Primerhybridisierung bei 55-65°C, (3) die Polymerase-Bindung und DNA-Synthese bei 72°C. Dieser Zyklus wird bis zu 40 Mal wiederholt.

### Quantitative Realtime PCR:

Die quantitative Realtime oder auch Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine Sonderform der oben beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion. Sie ermöglicht die photometrische Detektion der gebildeten

PCR-Produkte in Echtzeit. Ziel der Methode ist es, die spezifische Menge einer bestimmten cDNA-Sequenz der zu untersuchenden Probe zu quantifizieren, wodurch sich Rückschlüsse auf den ursprünglichen mRNA-Gehalt der Probe ziehen lassen. Es gibt verschiedene Technologien zur Messung der cDNA-Menge bei einer qPCR. In dieser Arbeit wurden die SYBR Green-Methode und die TaqMan-Sonden-Methode angewandt. Die SYBR Green-Methode beruht auf einer Fluoreszenz-Farbstoff-Komplexbildung zwischen dem Cyanin-Farbstoff SYBR Green und doppelsträngiger DNA. Es ist auch eine Bindung von SYBR Green an RNA oder einzelsträngige DNA möglich, die Lichtemission in diesem Fall ist dann jedoch sehr gering. Die TaqMan-Sonden-Methode beruht auf der Anlagerung einer fluorogenen Sonde an das 5' Ende des DNA-Strangs, welche einen Fluorophor und einen entsprechenden Quencher, der die Fluoreszenz des Fluorophors in der Sonde quencht, beinhaltet. Während der Polymerasereaktion wird das Fluorophor durch die Taq-Polymerase von der Sonde abgespalten und ihr Fluoreszenzsignal wird freigesetzt. Durch den proportionalen Zusammenhang zwischen PCR-Produkt-Menge und Fluoreszenzsignal in beiden Methoden ist eine Überwachung der Amplifikate während des gesamten Reaktionsverlaufs möglich. Die aufgezeichnete Menge der Fluoreszenzsignale wird als Amplifikationsplot über der Zykluszahl aufgetragen. Während einer qPCR wird der sogenannte  $C_t$ -Wert (Cycle threshold, Schwellenwertzyklus) ermittelt, welcher den Zyklus markiert, bei dem das Fluoreszenzsignal einer Probe signifikant aus dem Hintergrund hervortritt. Der  $C_t$ -Wert fließt in die Quantifizierung ein, welche absolut anhand eines mitgeführten Standards oder relativ mithilfe der  $\Delta\Delta CT$ -Methode erfolgen kann. Im Fall der relativen Quantifizierung wird der  $C_t$ -Wert der zu untersuchenden Probe in Relation zum  $C_t$ -Wert des Housekeeping-Gens gesetzt.

In dieser Arbeit wurde aus zuvor isolierter RNA hergestellte cDNA (s. 3.2.2.(1), 3.2.2.(2)) für die qPCR verwendet. Die Durchführung erfolgte am Thermocycler Rotorgene™ 6000 von Corbett. Mittels SYBR Green-Technik unter Verwendung von Biozym-Sonden wurden die Gene LGR5 full-length und LGR5 Delta5 gemessen. Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3 wurden mittels TaqMan-Sonden-Technologie untersucht. Die Auswertung erfolgte relativ mittels  $\Delta\Delta CT$ -Methode (s. 3.2.4.), in welcher RLP9 als Housekeeping-Gen verwendet wurde. Die unter Verwendung von Biozymsonden durchgeführte qPCR zur Überprüfung des LGR5 full-length- und des LGR5 Delta5-mRNA-Gehalts wurde nach folgendem Schema durchgeführt (s. Tabelle 12 und 13).

Tabelle 12: Pipettierschema qPCR LGR5 full-length, LGR5 Delta5

Komponenten	Konzentration (Reaktion)	Menge 1 Reaktion (10 $\mu$ l)
2x qPCR Blue Probe Mix	1x	5
Primer forward	200 nM	0,2
Primer reverse	200 nM	0,2
Probe	100 nM	0,1
Template DNA	100 ng	1

Nuklease-freies Wasser	3,5
Total $\Sigma$	10

Tabelle 13: Zykluschema qPCR LGR5 full-length, LGR5 Delta5

TEM [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl	PCR-Schritt
98	2	1	Initiale Denaturierung
98	5 sec	40x	Denaturierung
63	30 sec		Annealing

LGR5 full-length: 278, 279 Sonde: 767 (s. Tabelle 5)

LGR5 Delta5: 277, 279 Sonde: 767 (s. Tabelle 5)

Die qPCRs für die Untersuchung des mRNA-Gehalts von Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3 wurden unter Verwendung von FAM-TaqMan-Sonden nach folgendem Schema durchgeführt (s. Tabelle 14 und 15).

Tabelle 14: Pipettierschema qPCR Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3

Komponenten	Konzentration (Reaktion)	Menge 1 Reaktion
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	1x	6
TaqMan Gene Expression Assay FAM-Primer		0,3
TaqMan Gene Expression Assay VIC-Primer (RPL9)		0,3
Template DNA		1
Nuklease-freies Wasser		4,7
Total $\Sigma$		12,3

Tabelle 15: Zykluschema qPCR Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3

TEM [°C]	Zeit	Zyklenzahl	PCR-Schritt
95	10 min	1	Initiale Denaturierung
95	15 sec	40x	Denaturierung
60	1 min		Annealing

### 3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

#### (1) Proteinisolierung aus Zellkulturen und Konzentrationsbestimmung

Für den Westernblot zum Nachweis von LGR5 wurde das Protein mittels Lysis Puffer aus einem zuvor eingefrorenen Zellpellet isoliert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mithilfe des Ultraschallgeräts Sonopuls HD 2070 (Bandelin). Die Entfernung der Zelltrümmer erfolgte anschließend durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 15 000 rpm für 10 min. Der so gewonnene

proteinhaltige Überstand wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C bis auf weiteres aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Bradford-Methode, einer photometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen.

Die Zugabe einer Proteinprobe zur Bradfordreagenz resultiert in einer Farbänderung, welche auf einer Komplexbildung zwischen Protein und Reagenz beruht. Hierdurch verändert sich das Absorptionsspektrum, was photometrisch quantitativ gemessen werden kann (Bradford, 1976).

Zur Konzentrationsbestimmung in dieser Untersuchung wurde zunächst das Farbreagenz hergestellt, indem Bradford Reagenz (BIO-RAD) in einem Verhältnis von 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt wurde.

995µl dieses Farbreagenz wurden in eine farblose Kunststoffküvette vorgelegt und 5µl der zu untersuchenden Probe hinzugegeben. Die Küvette wurde mit einem Wachsstreifen verschlossen und mehrmals invertiert. Die Proben wurden für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595nm im Nanodrop 2000c (Thermo Fischer Scientific) gemessen. Als Blank wurden 5µl des Lysis Puffers genutzt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve.

## (2) SDS-Page und Blotting

Die SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Masse. Durch Zugabe von Natriumdodecyl-Sulfat zu einer Proteinprobe wird die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst und die Proteine werden proportional zu ihrer Masse negativ geladen. Nach Zugabe eines Reduktionsmittels, in der Regel Mercaptoethanol, und Glycerol wird die Probe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, welches an eine Strom- und Spannungsquelle angeschlossen wird. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine ist von ihrer Ladung und somit von ihrer Masse abhängig und ermöglicht so die Auftrennung der Proteine nach Größe, wobei die kleinsten Proteine am schnellsten mobilisiert werden.

In diesem Versuch wurden selbst gegossene 12% Trenngele und 5% Sammelgele verwendet. Die Zusammensetzung lautete wie folgt:

Tabelle 16: Zusammensetzung Trenngel

Komponenten	Konzentration	Menge 1 Reaktion [µl]
Tris pH 8,8	1,5 M	1320
Acrylamid	30%	2100
SDS	10%	52,5
APS	10%	52,5
TEMED		4,2
H <sub>2</sub> O		1390
Total Σ		5250

Tabelle 17: Zusammensetzung Sammelgel

Komponenten	Konzentration	Menge 1 Reaktion [ $\mu$ l]
Tris pH 6,8	1 M	328,13
Acrylamid	30%	446,25
SDS	10%	26,25
APS	10%	52,5
TEMED		2,63
H <sub>2</sub> O		1785
Total $\Sigma$		2610

Je Geltasche wurden 30  $\mu$ g des Proteins, versetzt mit 6  $\mu$ l LDS-Sample Buffer und 2  $\mu$ l Sample Reducing Agent, beides von Invitrogen, geladen. Als Marker dienten 10 $\mu$ l des PageRuler Plus Prestained Protein Ladder von Thermofischer Scientific. Vor dem Auftragen erfolgte nach kurzem Herunterzentrifugieren des Reaktionsansatzes die Denaturierung für 5min bei 95°C. Das Sammelgel lief anschließend für 15min bei 80V und 120mA, das Trenngel für eine Stunde bei 150V und 120mA bei 4°C. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte das Blotting, die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid). Hierzu wurde die Mini Trans Blot Cell von Biorad genutzt, als Transferpuffer diente der Novex Transfer Buffer (Invitrogen). Das Blotting selbst erfolgte bei 4°C, einer Spannung von 150V und einer Stromstärke von 120mA für zwei Stunden.

### (3) Western-Blot

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Milchpulver-TBST-Lösung über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte die dreimalige Waschung der Membran mit TBST-Lösung in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur. Dabei wurde zunächst zweimal für jeweils eine Minute gewaschen, der dritte Waschschrift erfolgte für 10 min. Im Anschluss wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in einer 10%igen Milchpulver-TBST-Lösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Blotten wurde das Bolt™-System genutzt und nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

Die Entwicklung fand hier im Fusion FX7 von peQLab statt.

### 3.2.4. Statistische Analysen

Die Auswertung der Daten der TOPFlash Assays und der Zellkoloniebildungstests zur Untersuchung des chemo- und strahlenbiologischen Verhaltens von Cal33 und FaDu erfolgte mithilfe von Microsoft-Excel 2013. Hierfür wurden die Funktionen Mittelwert, Standardabweichung und studentischer T-Test (zweiseitig ungepaart, bzw. zweiseitig gepaart) genutzt und ein Ereignis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $p \leq 0,05$ ) als

signifikant, 1% ( $p \leq 0,01$ ) als hoch signifikant und 10% ( $p \leq 0,1$ ) als tendenziell signifikant eingestuft.

Der zweiseitige gepaarte studentische T-Test wurde genutzt, wenn innerhalb einer LGR5-Modulation die Effekte der Bestrahlung bzw. der Cisplatintherapie, sowie der Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 im Falle der pLVX-Kontrollen miteinander verglichen wurden. Der zweiseitige ungepaarte studentische T-Test wurde verwendet, wenn zwischen den verschiedenen LGR5-Modulationen und den pLVX-Kontrollen verglichen wurde. Alle anderen genutzten Rechenoperationen sind im entsprechenden Methodenabschnitt aufgeführt.

Für eine bessere Übersicht wurden zur Beschreibung im Text die Messwerte der entsprechenden Kontrollen auf 100% gesetzt und die Reduktion durch therapeutische Behandlung in % in Bezug auf diese angegeben. Für den T-Test wurden nur absolute Daten verwendet, außer bei der Berechnung der Signifikanzen für die Unterschiede zwischen den SF. Hierfür wurden die relativen Plattiereffizienzen, bezogen auf die modulationseigene unbehandelte Kontrolle, miteinander verglichen. Für die Erhebung des IC50-Wertes der Cisplatin-Konzentrationen für beide Zelllinien wurde Origin und dessen Fitfunktion ExpDec1, sowie die Funktion FindXFromY genutzt. Die Formel zur Berechnung lautete hier  $y = A1 * \exp(-x/t1) + y0$ .

Um die Strahlendosis zu berechnen, bei der eine Reduktion der relativen Plattiereffizienz auf 10% des entsprechenden Kontrollwertes stattfindet ( $SF_{10}$ ), wurde mittels Origin ein linearquadratischer Fit angewendet, bei dem die Formel  $y = c * \exp(-(a * x + b * x^2))$  zur Berechnung genutzt und die Funktion FindXfromY verwendet wurde.

Zur Berechnung des DMF10, welcher angibt, ob es bei Erreichen der SF10 durch eine bestimmte Strahlendosis abhängig von einer LGR5-Modulation im Vergleich zur Kontrolle zu einer Strahlensensitivierung oder –Radioprotektion kommt, wurde der Quotient aus den o.g. Bestrahlungsdosen zur Erreichung der SF10 (Kontrolle/Modulation) berechnet. Ein Wert über 1 spricht für eine Sensitivierung, ein Wert unter 1 für eine Protektion. Ein DMF10 von 1 zeigt eine unveränderte Strahlensensitivität an.

Zur Berechnung des Enhancement-Faktors (Verstärkungsfaktors), der die Verstärkung der Reaktion auf Bestrahlung abhängig von der LGR5-Modulation darstellt, wurden die Mittelwerte der absoluten Plattiereffizienzen aller Versuche der verschiedenen Modulationen durch den Mittelwert der absoluten Plattiereffizienzen der Kontrolle dividiert.

Für die Auswertung der qPCRs wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode genutzt (Livak and Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die ermittelten  $C_t$ -Werte der untersuchten Gene mit den  $C_t$ -Werten des Housekeeping-Gens RPL9 normalisiert, indem der  $C_t$ -Wert des Referenzgens vom  $C_t$ -Wert des untersuchten Gens subtrahiert wurde. Nach der weiteren Berechnung gemäß der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurden alle Proben in Relation zur pLVX-Kontrolle gesetzt.

## 4. Ergebnisse

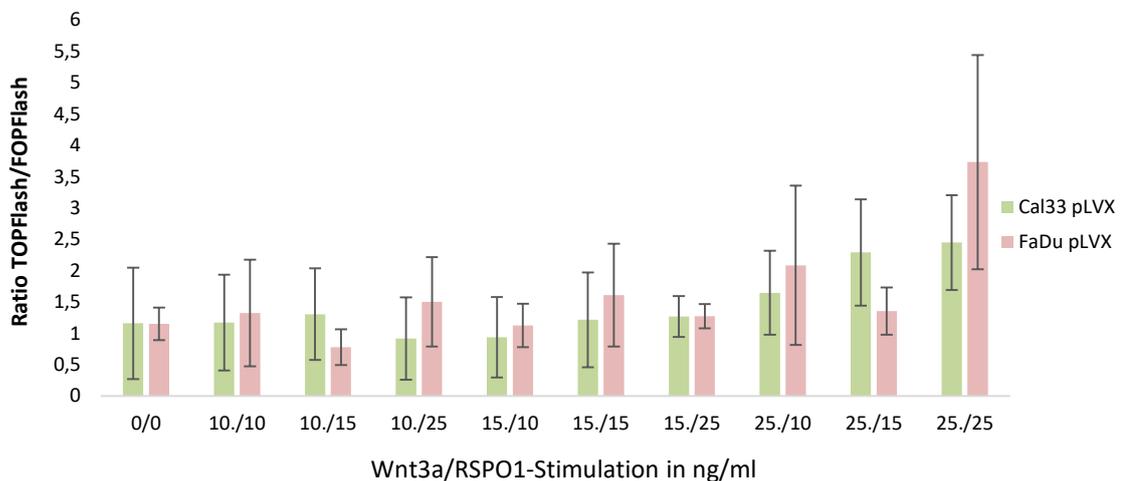
### 4.1. Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR

Zu Beginn und am Ende aller Versuchsreihen fand eine Kontrolle mittels qPCR und Westernblot statt, mit der geprüft wurde, ob jede gentechnisch veränderte Linie die genetische Veränderung zur LGR5-Modulation noch in sich trägt. Dies konnte sowohl im Vorhinein (Daten nicht gezeigt), als auch im Nachhinein (s. 4.6.) bestätigt werden.

### 4.2. Ermittlung der optimalen Konzentration für eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Zelllinien FaDu und Cal33

Die Aktivierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalwegs mittels Stimulation mit 150ng/mL Wnt3a in der Zelllinie FaDu wurde bereits in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe (Masterarbeit Sarah Luiken, 2015) gezeigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine deutliche Aktivitätssteigerung des Wnt-Signalweges in der Zelllinie Cal33 nur durch Stimulation mit Wnt3a in Kombination mit RSPO1 zu erreichen ist.

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es, mittels TOPFlash/FOPFlash Reporter-Assay die Konzentration für Wnt3a und RSPO1 zu bestimmen, bei der eine mäßige Aktivierung des kanonischen  $\beta$ -Catenin-vermittelten Wnt-Signalweges in beiden Zelllinien stattfindet.



**Abbildung 7: Aktivität des TOPFlash Reporters in FaDu und Cal33**

Dargestellt ist der Ratio der relativen Lumineszenz des TOPFlashes/FOPFlashes (M50/M51) der Zelllinien FaDu pLVX und Cal33 pLVX in Abhängigkeit der getesteten Wnt3a- und RSPO1-Konzentrationen. Es wurden fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (n=5).

In der Zelllinie FaDu pLVX ist nach Stimulierung mit 25ng/ml Wnt3a und 25ng/ml RSPO1 eine Erhöhung der Aktivität des Signalweges auf das ca. 3,8 fache ( $p=0,423$ ) im Vergleich zur nicht

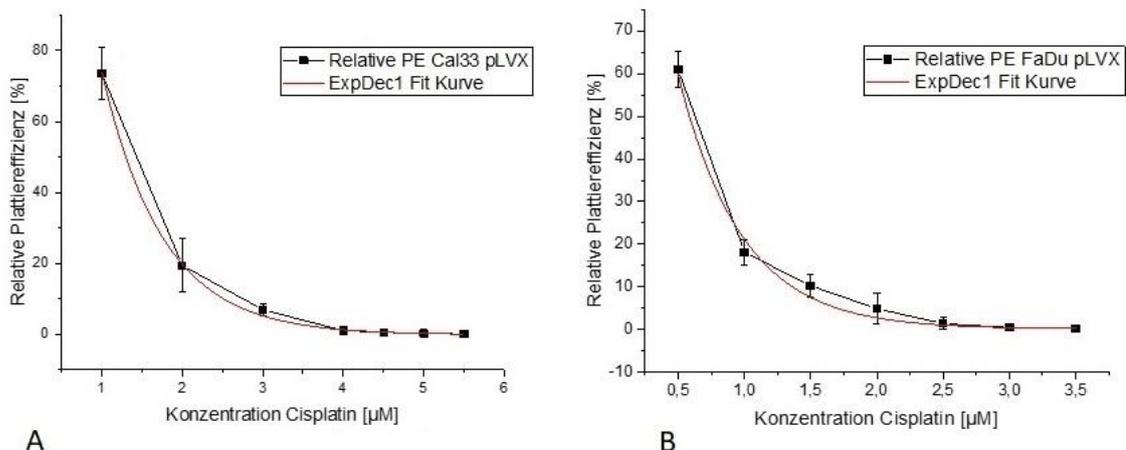
stimulierten Kontrolle zu verzeichnen. In der Zelllinie Cal33 pLVX war bei der Stimulierung mit 25ng/ml Wnt3a und 25ng/ml RSPO1 eine Steigerung der Aktivität auf das ca. 2,4 fache ( $p=0,223$ ) zu verzeichnen.

Anhand dieses Experiments wurde die Stimulationskonzentration 25ng/ml für Wnt3a und 25ng/ml für RSpondin1 zur mäßigen Aktivierung des Wnt-Signalweges für beide Zelllinien ausgewählt.

### 4.3. Ermittlung des IC50-Wertes für Cisplatin

In Vorbereitung auf die Hauptversuchsreihen wurden die IC50-Werte einer Cisplatin-Behandlung für beide Zelllinien im Zellkoloniebildungstest bestimmt.

Zur Ermittlung des groben Bereichs, in dem der IC50-Wert liegt, wurden mehrere Vorversuche mit Cisplatin im Konzentrationsbereich von 0,1-20 $\mu$ M für beide Zelllinien durchgeführt. Anschließend erfolgten jeweils drei Hauptversuche, um den IC50-Wert möglichst exakt zu bestimmen. Die Zelllinie Cal33 pLVX wurde mit Konzentrationen von 1-5,5 $\mu$ M behandelt. Für FaDu pLVX ergaben sich nach den Vorversuchen zu testende Behandlungskonzentrationen von 0,5-3,5 $\mu$ M.



**Abbildung 8: A und B. ExpDec1-Fit der klonogenen Überlebensrate nach Behandlung mit Cisplatin der Zelllinie Cal33 pLVX (A) und der Zelllinie FaDu pLVX (B)**

Gezeigt sind die logarithmisch verlaufenden dosisabhängigen Wirkungskurven von Cal33 pLVX und FaDu pLVX nach Cisplatinbehandlung. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt ( $n=3$ ).

Für Cal33 pLVX konnte nach drei unabhängigen Versuchen mittels OriginPro18b ein IC50-Wert von 1,297 $\mu$ M mit einem oberen 95% Konfidenzintervall von 1,374 und einem unteren 95% Konfidenzintervall von 1,212 bestimmt werden.

Die FaDu pLVX stellte sich in den Koloniebildungstests im Vergleich zu Cal33 pLVX etwas empfindlicher gegenüber der Cisplatinbehandlung dar. Mittels Origin Pro18b konnte nach drei unabhängigen Versuchen ein IC50-Wert von  $0,586\mu\text{M}$  mit einem oberen 95% Konfidenzintervall von  $0,64715$  und einem unteren von  $0,51201$  ermittelt werden.

Daraufhin wurde für die bevorstehenden Hauptversuchsreihen für die Zelllinie Cal33 eine Cisplatinkonzentration von  $1,3\mu\text{M}$  und für die Zelllinie FaDu die Konzentration  $0,58\mu\text{M}$  gewählt.

#### 4.4. Bestrahlungsvorversuche

Neben dem IC50-Wert für Cisplatin wurden für die Hauptversuche zwei Bestrahlungsdosen ausgewählt. Als Orientierungswerte dienten Werte aus der Vorarbeit von Sarah Luiken. Es wurden Strahlendosen von 2-6 Gray verwendet.

In zwei daraufhin durchgeführten Vorversuchen konnten zwischen 2 und 4Gy keine übermäßigen Unterschiede festgestellt werden und so wurden die Bestrahlungsdosen 3 und 6Gy für diese Arbeit ausgewählt. Ein weiterer Vorversuch mit diesen Dosen wurde durchgeführt und lieferte gut auswertbare Daten.

#### 4.5. Untersuchung des strahlenbiologischen Verhaltens und der Chemosensitivität nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 von Zellen mit veränderter LGR5-Expression

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich eine Modulation der LGR5-Expression auf das Ansprechen von humanen HNO-Tumorzelllinien auf eine radio-, bzw. chemotherapeutische Behandlung auswirkt, wenn die Aktivierung des LGR5- und des Wnt-Signalweges durch definierte Zugabe exogener Liganden gewährleistet ist.

In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe wurde der verstärkende Effekt von Wnt3a und RSPO1 auf die Aktivierung des kanonischen  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs in allen hier verwendeten LGR5-Modulationen bereits gezeigt (Luiken, 2015). Die Stimulationskonzentration für eine mäßige Aktivierung wurde in dieser Arbeit in einem Vorversuch bestimmt. Für beide Zelllinien konnte eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei einer Konzentration von  $25\text{ng/ml}$  Wnt3a und  $25\text{ng/ml}$  RSPO1 festgestellt werden (s. 4.2.).

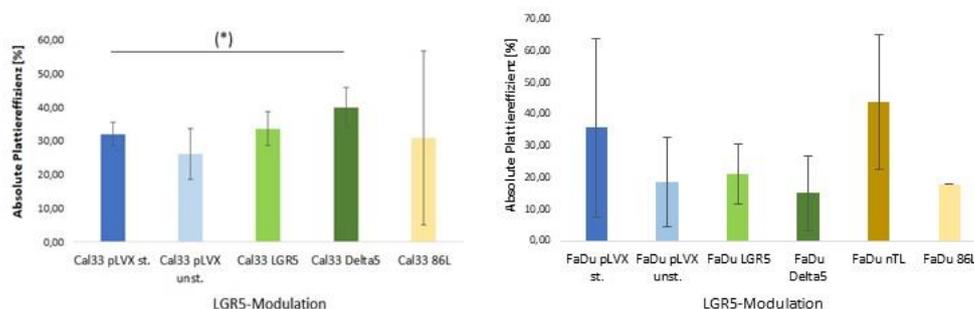
Die Untersuchung des strahlenbiologischen Verhaltens und der Chemosensitivität erfolgte mittels Zellkoloniebildungstests. Zusätzlich wurde in beiden Zelllinien eine nicht stimulierte Kontrolle mitgeführt, um den Effekt der Stimulation auf das klonogene Überleben der Kontrolle ohne sowie unter Strahlen- oder/und Chemotherapie zu untersuchen.

In allen Versuchen wurde auf die Einhaltung der identischen Versuchsbedingungen geachtet, biologische Schwankungen traten dennoch auf. Im Wesentlichen wurde der Koloniebildungstest als bewertbar angenommen, wenn mehr als 10 Kolonien und weniger als 250 Kolonien gezählt werden konnten.

#### 4.5.1. Effekt der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten zur Modulation der LGR5-Expression

Zunächst wurde das klonogene Zellüberleben der beiden Zelllinien FaDu und Cal33 nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 abhängig von der Modulation der LGR5-Expression untersucht.

Die Kontrolle für alle LGR5-Modulationen der Zelllinie Cal33 war in diesen Versuchen Cal33 pLVX (stimuliert). Eine nTL-Modulation als Kontrolle für den LGR5-Knockdown Cal33 86L wurde zwar experimentell stets mitgeführt, zeigte in der Auswertung jedoch immense Schwankungen und teilweise nicht auswertbare Daten, sodass sie hier nicht berücksichtigt wird. Für die Berechnung des klonogenen Überlebens wurden die Plattiereffizienzen der verschiedenen Modulationen in jedem Einzelversuch auf die pLVX-Kontrolle des jeweiligen Versuchsdurchgangs bezogen und anschließend der Mittelwert berechnet.



**Abbildung 9 (A, B): Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in den Zelllinie Cal33 (A) und FaDu (B)**

Dargestellt ist das klonogene Überleben der Zelllinien Cal33 und FaDu in Kulturen mit unterschiedlicher LGR5-Expression. Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle pLVX sind alle Zellen vor dem Einstreuen in den Koloniebildungstest für 72 h mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei mindestens drei Datensätze in jeder Modulation zu erheben waren ( $n=3$ ). Für die FaDu-Zelllinie wurden sieben voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei für alle Variationen bis auf 86L mindestens drei Datensätze erhoben werden konnten ( $n=3$ ). Für FaDu 86L war nur ein Versuch auswertbar.

Das klonogene Überleben der Leervektorkontrolle Cal33 pLVX ohne Stimulation war um ca. 20 % ( $p=0,242$ ) geringer als nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1.

Die Überexpression von LGR5 full-length in der Zelllinie Cal33 hat nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle keinen Einfluss auf das klonogene

Überleben, während die Überexpression von LGR5 Delta5 zu einer Erhöhung des klonogenen Zellüberlebens um ca. 25% führt. Diese Steigerung ist tendenziell signifikant ( $p=0,091$ ).

Der Knockdown der LGR5-Varianten nach Stimulation zeigt dahingegen keinen Effekt auf das klonogene Überleben in der Zelllinie Cal33. Cal33 86L-Zellen wiesen große Schwankungen in diesen Messreihen auf, wodurch die Auswertung nur unter Vorbehalt möglich war.

Die Zelllinie FaDu unterlag im Laufe der Versuche generell großen Schwankungen und es wurden fehlende Werte wegen des Nichtanwachsens von Zellen festgestellt. Aufgrund dieser Schwankungen und Fehlwerte werden im Folgenden im Wesentlichen die Mittelwerte der absoluten Plattiereffizienzen aller Versuche mit dem Mittelwert der absoluten Plattiereffizienzen der stimulierten pLVX-Kontrolle aller Versuche verglichen.

Das klonogene Überleben der Leervektorkontrolle FaDu pLVX ohne Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 war 50% geringer im Vergleich zur stimulierten FaDu pLVX Kontrolle ( $p=0,300$ ) und damit ausgeprägter als in der Zelllinie Cal33.

Die Überexpression von LGR5 full-length in der Zelllinie FaDu führte nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 40% im Vergleich zur stimulierten FaDu pLVX-Kontrolle ( $p=0,461$ ).

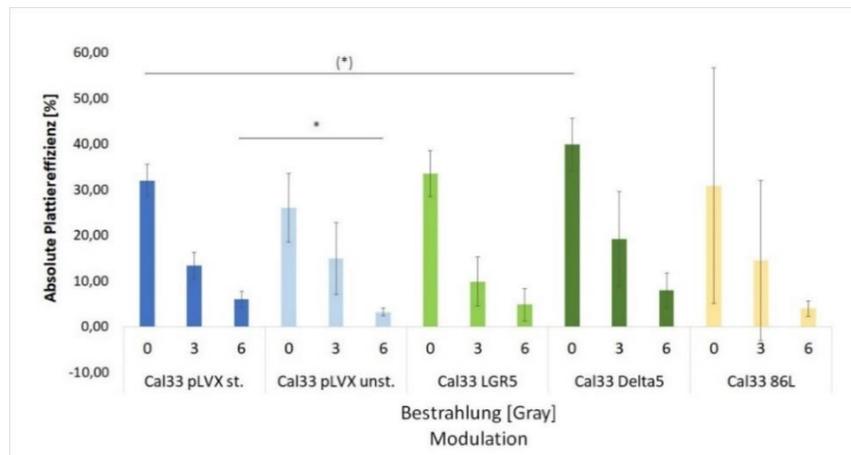
Die Überexpression der Spleißvariante LGR5 Delta5 resultierte in der Zelllinie FaDu nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 60% ( $p=0,287$ ) im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle.

Die Kontrolle FaDu nTL zeigte im Mittel ein erhöhtes klonogenes Überleben nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle pLVX ( $p=0,664$ ).

Für den LGR5-Knockdown in der FaDu 86L nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 konnte kein Ergebnis erhoben werden, da ein Anwachsen der Zellen im Zellkoloniebildungstest überhaupt nur bei einem von sieben durchgeführten Versuchen gelang.

Durch die beträchtlichen Schwankungen der Ergebnisse in der FaDu-Zelllinie ist keine statistisch abgesicherte Wertung möglich. Die Überexpression von LGR5 full-length, LGR5 Delta5 sowie ein Knockdown beider Varianten führten jedoch tendenziell zu einer Senkung des klonogenen Überlebens, wenn die FaDu-Zellen gleichzeitig mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert wurden.

#### 4.5.2. Einfluss der Modulation der LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten



**Abbildung 10: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist das klonogene Überleben der Zelllinie Cal33 nach Bestrahlung mit den Dosen 3Gy und 6Gy abhängig von der Modulation der LGR5-Expression.

Bis auf die mitgeführte unstimulierte pLVX-Kontrolle sind alle Zellen vor der Radiotherapie für 72h mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden mehr als drei unabhängige Versuche durchgeführt ( $n \geq 3$ ). Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen nicht stimulierter und stimulierter pLVX-Kontrolle und wird wie folgt angegeben:  $*=p < 0,05$ . Ein tendenziell signifikanter Unterschied im klonogenen Überleben besteht zwischen Cal33 LGR5 Delta5 und der stimulierten pLVX-Kontrolle und wird wie folgt angegeben:  $(*)=p < 0,1$ .

In der Zelllinie Cal33 führte eine Bestrahlung von sowohl stimulierter als auch nicht stimulierter pLVX-Kontrolle zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um etwa 50% bei 3Gy ( $p_{pLVXst.} = 0,025$ ;  $p_{pLVXunst.} = 0,021$ ) und um etwa 80% bei 6Gy ( $p_{pLVXst.} = 0,006$ ;  $p_{pLVXunst.} = 0,012$ ).

Nach Stimulation liegt die Bestrahlungsdosis, um die  $SF_{10}$  zu erreichen, in der Leervektorkontrolle pLVX in der Zelllinie Cal33 bei 8,5Gy, ohne Stimulation bei 6,6Gy.

Somit hat die Stimulation der Leervektorkontrolle in der Zelllinie Cal33 bei einer Strahlendosis von 3Gy keinen signifikanten Einfluss auf das klonogene Zellüberleben im Vergleich zur Leervektorkontrolle ohne Stimulation. Bei einer Strahlendosis von 6Gy ist jedoch eine tendenziell signifikante Reduktion ( $p = 0,098$ ) des klonogenen Überlebens ohne Stimulation um ca. 40% im Vergleich zur mit Wnt3a/ RSPO1 stimulierten pLVX-Kontrolle zu beobachten.

In den LGR5 full-length überexprimierenden Cal33-Zellen führte die Bestrahlung nach Stimulation zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 70% bei 3 Gy ( $p = 0,001$ ) und um ca. 90% bei 6 Gy ( $p = 0,0002$ ).

Eine Bestrahlungsdosis zur Erreichung der  $SF_{10}$  konnte in der Zelllinie Cal33 für LGR5 full-length überexprimierende Zellen nicht kalkuliert werden.

Im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle hat die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden Cal33-Zellen nach Stimulation eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 30% ( $p = 0,301$ ) bei 3Gy und um ca. 25% ( $p = 0,575$ ) bei 6Gy zur Folge.

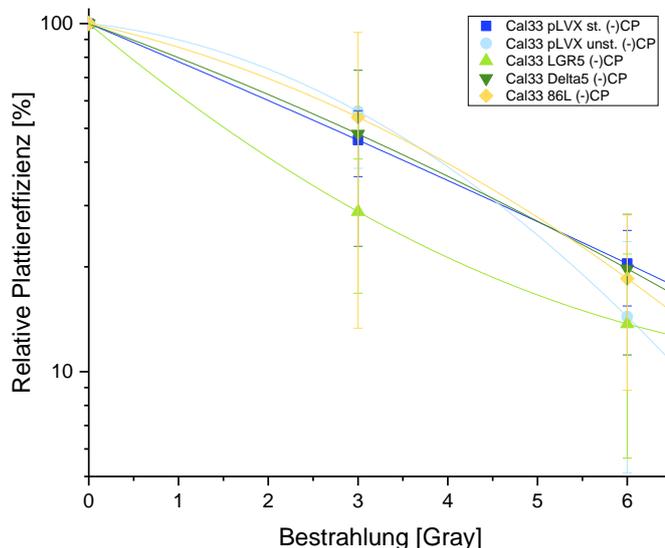
Die Bestrahlung der LGR5 Delta5 überexprimierenden Cal33-Zellen führte nach Stimulation zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 50% bei 3Gy ( $p=0,032$ ) und um ca. 80% bei 6Gy ( $p=0,0001$ ). Die Bestrahlungsdosis, bei welcher die  $SF_{10}$  von LGR5 Delta5 überexprimierenden Zellen der Zelllinie Cal33 erreicht wurde, lag bei 8,0Gy.

Im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle konnte nach Bestrahlung bei den LGR5 Delta5 überexprimierenden Cal33-Zellen nach Stimulation eine Steigerung des klonogenen Zellüberlebens um je ca. 30% ( $p_{3Gy}=0,322$ ;  $p_{6Gy}=0,381$ ) beobachtet werden.

Die Bestrahlung der Cal33-Zellen mit einem LGR5-Knockdown (86L) führte nach Stimulierung zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 50% bei 3Gy ( $p=0,174$ ) und um ca. 80% bei 6Gy ( $p=0,190$ ).

Die Bestrahlungsdosis zur Erreichung der  $SF_{10}$  der Cal33-Zellen mit LGR5-Knockdown lag bei 7,3Gy.

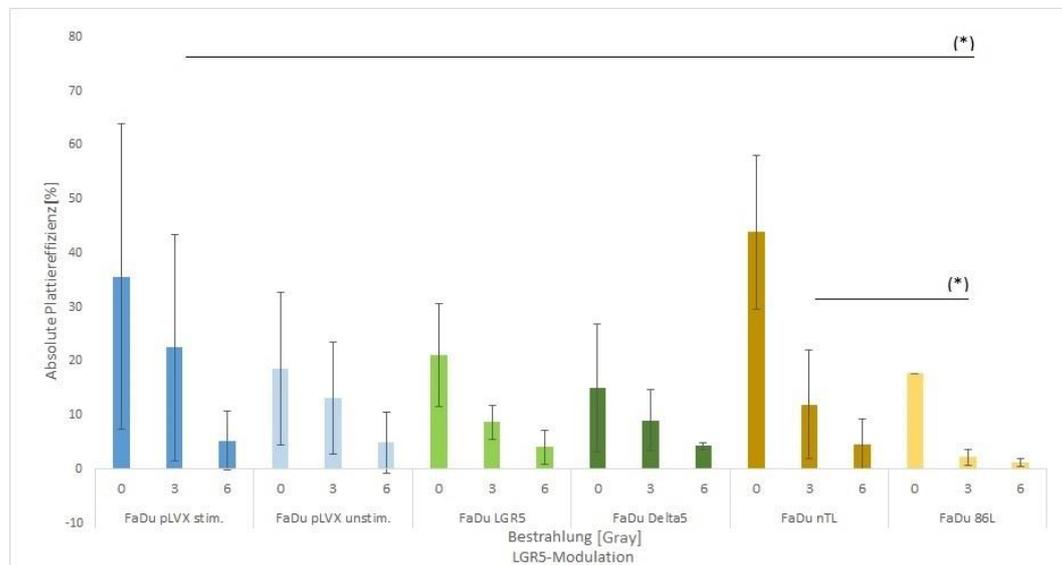
Im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle wurde nach Bestrahlung mit 3Gy bei den Cal33-Zellen mit LGR5-Knockdown (86L) keine Veränderung des klonogenen Überlebens festgestellt. Nach einer Bestrahlung mit 6Gy zeigte der Knockdown eine Reduktion des klonogenen Überlebens im Vergleich zur pLVX-Kontrolle um 35%, was jedoch nur mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 14,6 % gezeigt werden konnte ( $p=0,146$ ).



**Abbildung 11: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist der linearquadratische Fit der klonogenen Überlebensrate der Zelllinie Cal33 nach Bestrahlung abhängig von der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten. Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle Cal33 pLVX sind alle Zellen vor der Radiotherapie für 72 h mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt ( $n=3$ ) [(-)CP: Datensätze ohne Cisplatinbehandlung].

Es scheint, dass Cal33-Zellen mit LGR5 full-length Überexpression auf eine Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich sensitivier reagiert. Dennoch ist diese scheinbare Radiosensitivierung der Zellen mit LGR5 full-length Überexpression im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle nicht signifikant.



**Abbildung 12: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist das klonogene Überleben der Zelllinie FaDu in Abhängigkeit von Bestrahlung und der Modulation der LGR5-Expression. Bis auf die mitgeführte unstimulierte pLVX-Kontrolle sind alle Zellen vor der Radiotherapie für 72h mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden sieben voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei in jeder Modulation und Bestrahlungsdosis bis auf 86L unbestrahlt mindestens drei Datensätze zu erheben waren (n=3). Tendentiell signifikante Unterschiede beziehen sich auf den LGR5-Knockdown nach einer Bestrahlung mit 3Gy im Vergleich zur stimulierten pLVX Kontrolle bei 3Gy, bzw. zur nTL-Kontrolle bei 3Gy und werden wie folgt angegeben: (\*)= $p < 0,1$ .

In der Zelllinie FaDu führte eine Bestrahlung der stimulierten pLVX-Kontrolle zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 40% bei 3Gy ( $p=0,113$ ) und um 90% bei 6Gy ( $p=0,038$ ). Ohne Stimulation wurde das klonogene Zellüberleben in den FaDu-Zellen, welche mit dem Leervektor pLVX behandelt wurden, bei 3Gy um 30% ( $p=0,236$ ) und bei 6Gy um 75% ( $p=0,150$ ) reduziert. Nach Stimulation liegt die Bestrahlungsdosis zur Erreichung der SF<sub>10</sub> der Leervektorkontrolle pLVX in der Zelllinie FaDu bei 5,8Gy, ohne Stimulation hingegen bei 10,0Gy.

In der Leervektorkontrolle hatte die Stimulation bei einer Strahlendosis von 3Gy eine Erhöhung des klonogenen Zellüberlebens um etwa 10% im Vergleich zur Leervektorkontrolle ohne Stimulation zur Folge ( $p=0,468$ ). Bei einer Strahlendosis von 6Gy war kein Unterschied zwischen den stimulierten mit dem pLVX-Vektor behandelten FaDu-Zellen und den unstimulierten mit dem pLVX-Vektor behandelten FaDu-Zellen nachweisbar.

Die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden FaDu-Zellen führte nach Stimulation

zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 60% ( $p=0,162$ ) bei 3Gy und um ca. 80% ( $p=0,114$ ) bei 6Gy.

Eine Bestrahlungsdosis zur Erlangung der SF<sub>10</sub> konnte in der Zelllinie FaDu für LGR5 full-length überexprimierende Zellen nicht kalkuliert werden.

Im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle hatte die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden FaDu-Zellen mit Stimulation eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 60% bei einer Strahlendosis von 3Gy ( $p=0,238$ ) und um 10% bei einer Strahlendosis von 6Gy ( $p=0,848$ ) zur Folge.

Die Bestrahlung der LGR5 Delta5 überexprimierenden FaDu-Zellen führte nach Stimulation zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 40% bei 3Gy ( $p=0,176$ ) und um ca. 70% bei 6Gy ( $p=0,136$ ).

Die Bestrahlungsdosis zur Erlangung der SF<sub>10</sub> der LGR5 Delta5 überexprimierenden Zellen der Zelllinie FaDu lag bei 8,1Gy.

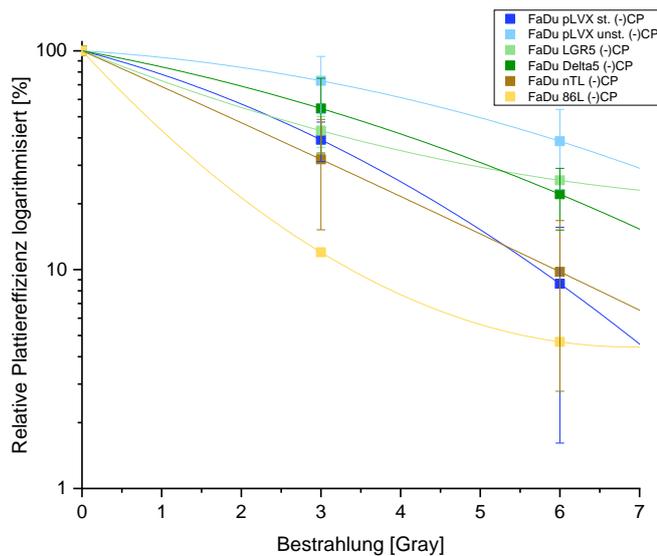
Im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle hatte die LGR5 Delta 5-Überexpression bei Bestrahlung nach Stimulation eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 60% bei einer Strahlendosis von 3Gy ( $p=0,161$ ) und um etwa 6% bei 6Gy ( $p=0,912$ ) zur Folge.

Die Bestrahlung der FaDu-Zellen nach LGR5-Knockdown (86L) in Kombination mit einer Stimulation führte zu einer Verringerung des klonogenen Zellüberlebens um 88% (3Gy) und um ca. 93% bei einer Bestrahlungsdosis von 6Gy. Signifikanzen konnten an dieser Stelle durch fehlende Kontrollwerte nicht berechnet werden.

Die Bestrahlungsdosis zum Erreichen der SF<sub>10</sub> der FaDu-Zellen nach einem LGR5-Knockdown lag bei 3,4Gy.

Im Vergleich hatte ein LGR5-Knockdown (86L) nach Stimulation mit Wnt3a/RSPO1 sowie einer Bestrahlung mit 3Gy in FaDu-Zellen eine tendenziell signifikante Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 90% verglichen mit Zellen mit pLVX-Vektor und um etwa 80% im Vergleich zu Zellen mit nTL-Vektor zur Folge ( $p_{pLVX\ st./86L}=0,062$ ,  $n=5$ ;  $p_{nTL/86L}=0,065$ ,  $n=4$ ). Eine Bestrahlung mit 6Gy resultierte in einer Verringerung des klonogenen Überlebens von FaDu-Zellen mit LGR5-Knockdown im Vergleich zu beiden Kontrolle um ca. 70% ( $p_{pLVX\ st./86L}=0,170$ ,  $n=5$ ;  $p_{nTL/86L}=0,107$ ,  $n=5$ ).

Demnach lässt sich feststellen, dass ein LGR5-Knockdown in der Zelllinie FaDu zu einer Radiosensitivierung führt.



**Abbildung 13: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist der linearquadratische Fit der klonogenen Überlebensrate der Zelllinie FaDu nach Bestrahlung abhängig von der Modulation der LGR5-Expression. Bis auf die mitgeführte unstimulierte pLVX-Kontrolle sind alle Zellen vor der Radiotherapie für 72h mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Für die Relativierung wurde der modulationseigene 0Gy-Kontrollwert herangezogen. Es wurden sieben voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei für 3Gy pLVX unst. und 3Gy LGR5 full-length nur zwei Werte (n=2) und für 86L nur ein Wert bei 0Gy, 3Gy und 6Gy zu eruieren waren, für alle anderen Messpunkte waren mindestens drei Werte zu erheben (n=3).

In Abbildung 13 ist das verstärkte Ansprechen auf Bestrahlung von FaDu-Zellen mit LGR5-Knockdown im Vergleich zur Kontrolle und allen anderen Modulationen verdeutlicht.

Tabelle 18: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF<sub>10</sub> [Gy] und DMF10 der Zelllinie Cal33

	Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF <sub>10</sub> [Gy]		DMF10
Cal33 pLVX st.	8,5		
Cal33 pLVX unst.	6,6	pLVX st./ pLVX unst.	1,29
Cal33 LGR5	-*	pLVX st./LGR5	-*
Cal33 Delta5	8,0	pLVX st./Delta5	1,06
Cal33 86L	7,3	pLVX st./86L	1,16

\*Dieser Wert konnte nicht kalkuliert werden.

Tabelle 19: Verstärkungsfaktor bei 3 und 6Gy in der Zelllinie Cal33

	EF 3 Gy	p	EF 6 Gy	p
Cal33 pLVX unst./ pLVX st.	1,12	0,72	<b>0,54</b>	<b>0,03</b>
Cal33 LGR5/pLVX st.	0,74	0,30	0,81	0,57
Cal33 Delta5/ pLVX st.	1,43	0,32	1,33	0,38
Cal33 86L/ pLVX st.	1,09	0,90	0,66	0,15

Tabelle 20: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF<sub>10</sub> [Gy] und DMF10 der Zelllinie FaDu

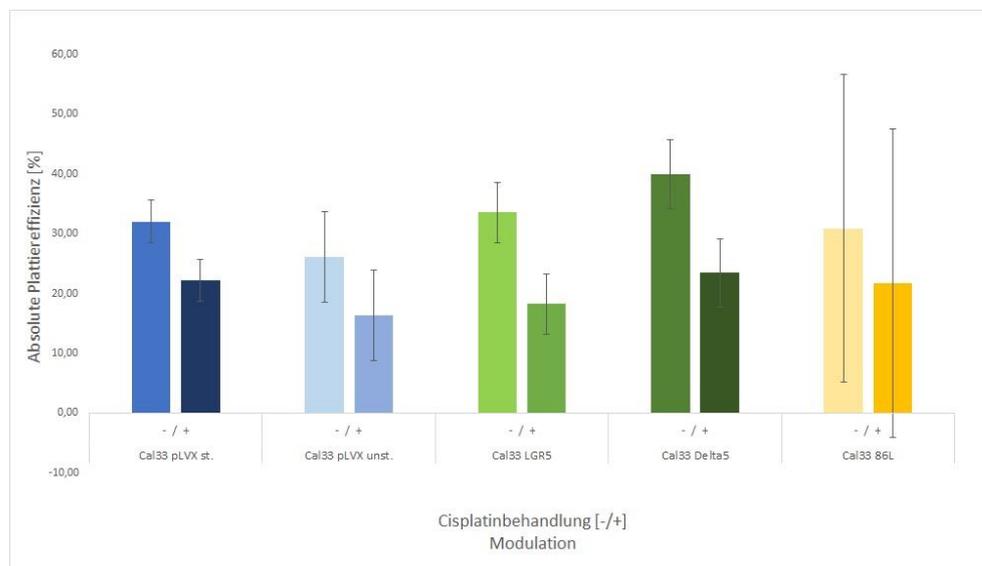
	Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF <sub>10</sub> [Gy]		DMF10
FaDu pLVX st.	5,8		
FaDu pLVX unst.	10,0	pLVX st./ pLVX unst.	0,58
FaDu LGR5	-*	pLVX st./LGR5	-*
FaDu Delta5	8,1	pLVX st./ Delta5	0,72
FaDu nTL	5,9	pLVX st./ nTL	0,98
FaDu 86L	3,4	pLVX st./ 86L	1,7
		nTL/86L	1,73

\*Dieser Wert konnte nicht kalkuliert werden.

Tabelle 21: Verstärkungsfaktor bei 3 und 6Gy in der Zelllinie FaDu

	EF 3 Gy	p	EF 6 Gy	p
FaDu pLVX unst./ pLVX st.	0,54	0,79	1,07	0,92
FaDu LGR5/pLVX st.	0,39	0,24	0,89	0,85
FaDu Delta5/ pLVX st.	0,40	0,16	0,94	0,91
FaDu nTL/pLVX st.	0,53	0,39	1,02	0,97
FaDu 86L/pLVX st.	<b>0,10</b>	<i>0,06</i>	0,29	0,17
FaDu 86L/nTL	<b>0,18</b>	<i>0,07</i>	0,28	0,11

#### 4.5.3. Einfluss der Modulation der LGR5-Expression auf die Chemosensitivität



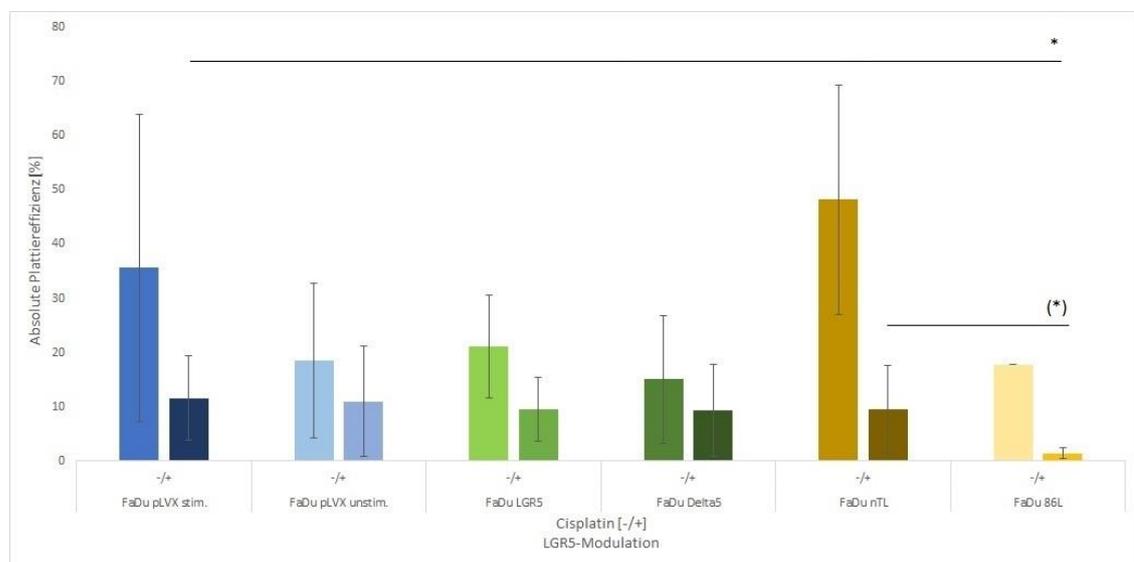
**Abbildung 14: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Cisplatin in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist das klonogene Überleben der Zelllinie Cal33 nach Cisplatinbehandlung abhängig von der Modulation der LGR5-Expression.

Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle Cal33 pLVX sind alle Zellen 24h vor der Cisplatinbehandlung und über die 48 stündige Dauer der Cisplatinbehandlung mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (n=3).

In der Zelllinie Cal33 führte eine Cisplatinbehandlung in der Konzentration des IC50-Wertes unabhängig von der LGR5-Expression und Stimulation zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens durchschnittlich um ca. 35% im Vergleich zur Kontrolle (Cal33 pLVX st. um 30,5% ( $p=0,033$ ); Cal33 pLVX unst. um 37,1% ( $p=0,16$ ), Cal33 LGR5 full-length um 45,7% ( $p=0,16$ ), Cal33 LGR5 Delta5 um 41,3% ( $p=0,01$ ), Cal33 86L um 29,8% ( $p=0,59$ )). Ein signifikanter Unterschied in der Reduktion des klonogenen Überlebens durch Cisplatinbehandlung zwischen den LGR5-modulierten Zelllinien konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann formuliert werden, dass eine veränderte LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33 keine Auswirkung auf die Chemosensitivität hat.



**Abbildung 15: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Cisplatin in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist das klonogene Überleben der Zelllinie FaDu nach Cisplatinbehandlung abhängig von der Modulation der LGR5-Expression.

Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle FaDu pLVX sind alle Zellen für 24 h vor der Cisplatinbehandlung und über die 48 stündige Dauer der Cisplatinbehandlung mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden sieben voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei für jede Modulation außer 86L unbehandelt mindestens drei absolute Daten zu erheben waren. Signifikante Unterschiede beziehen sich für 86L auf die mit Cisplatin behandelte stimulierte pLVX- und nTL-Kontrolle und werden wie folgt angegeben: (\*)= $p<0,1$ ; \*= $p<0,05$ .

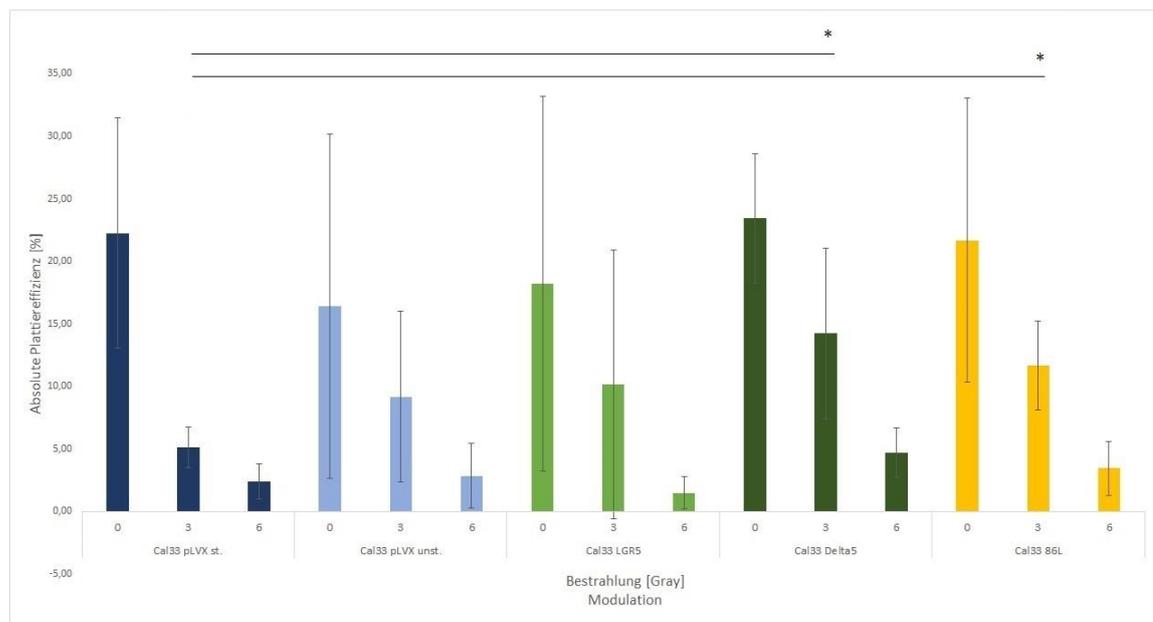
In der Zelllinie FaDu reduzierte eine Cisplatinbehandlung in der IC50-Konzentration das klonogene Überleben der Leervektorkontrolle pLVX unter Stimulation um ca. 70% ( $p=0,067$ ), in der unstimulierten pLVX-Kontrolle um etwa 40% ( $p=0,187$ ), in den LGR5 full-length überexprimierenden FaDu-Zellen um ca. 55%, in denen mit LGR5 Delta5-Überexpression um ca. 40%. Bei den FaDu nTL-Zellen wurde das klonogene Zellüberleben durch Cisplatintherapie nach Stimulation um etwa 80% reduziert ( $p=0,022$ ).

Ein abgesichertes Ergebnis für die Reduktion des klonogenen Zellüberlebens durch Cisplatintherapie bei LGR5-Knockdown in der Zelllinie FaDu (86L) war leider nicht festzustellen,

da für die Kontrolle ohne Cisplatintherapie nur bei einem von sieben Versuchen ein Wert zu erheben war. Bezieht man sich auf diesen, kommt es nach Cisplatinbehandlung bei FaDu-Zellen mit LGR5-Knockdown zu einer Reduktion des Überlebens um ca. 90%.

Bei Vergleich der mit Cisplatin behandelten Zellen mit LGR5 Knockdown (86L) mit den ebenfalls mit Cisplatin behandelten Kontrollen pLVX stimuliert und nTL, zeigte sich eine signifikante ( $p_{pLVXst./86L\ 0Gy(+)\ CP}=0,039$ ,  $n=4$ ) bis tendenziell signifikante ( $p_{nTL/86L\ 0Gy(+)\ CP}=0,093$ ,  $n=4$ ) Reduktion des klonogenen Überlebens um ca. 85%, was für eine Chemosensitivierung nach LGR5-Knockdown in der Zelllinie FaDu spricht.

#### 4.5.4. Effekt der Modulation der LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität nach kombinierter Behandlung



**Abbildung 16: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung abhängig von der Modulation der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33. Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle Cal33 pLVX sind alle Zellen 24 h vor der Cisplatinbehandlung und über deren 48 stündige Dauer, d.h. über 72 h vor der Bestrahlung, mit Wnt3a und RSPO1 stimuliert worden. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt ( $n=4$ ).

In der Zelllinie Cal33 führte die Bestrahlung der stimulierten Leervektorkontrolle pLVX mit 3 Gy im Anschluss an die Cisplatintherapie zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um etwa 75% ( $p=0,038$ ), mit 6 Gy um ca. 90% ( $p=0,023$ ), bzw. in der unstimulierten Leervektorkontrolle pLVX um ca. 35% ( $p=0,204$ ) (3Gy), bzw. um etwa 80% ( $p=0,096$ ) (6 Gy).

---

Im Vergleich zur stimulierten Kontrolle war eine Steigerung des klonogenen Überlebens der nicht stimulierten Cal33 pLVX-Zellen nach einer Bestrahlung mit 3 Gy im Anschluss an eine Cisplatintherapie um 80% ( $p=0,265$ ), nach einer Bestrahlung mit 6 Gy um 20% ( $p=0,577$ ) feststellbar.

Die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden Cal33-Zellen nach Stimulation im Anschluss an eine Chemotherapie führte zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 40% bei einer Strahlendosis von 3 Gy ( $p=0,144$ ) und um 90% bei einer Strahlendosis von 6 Gy ( $p=0,113$ ).

Im Vergleich zu der stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden Cal33-Zellen nach Stimulation im Anschluss an eine Cisplatinbehandlung eine Steigerung des klonogenen Zellüberlebens um ca. 100% (3 Gy) ( $p=0,390$ ) und eine Senkung um ca. 40% (6 Gy) ( $p=0,366$ ) zur Folge, wobei hier anzumerken ist, dass die Ergebnisse großen Schwankungen unterlagen und diese nicht signifikant sind.

Mit dem gleichen Regime für LGR5 Delta5 überexprimierende Cal33-Zellen kam es zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 40% bei 3 Gy ( $p=0,010$ ) und um 80% bei 6 Gy ( $p=0,002$ ).

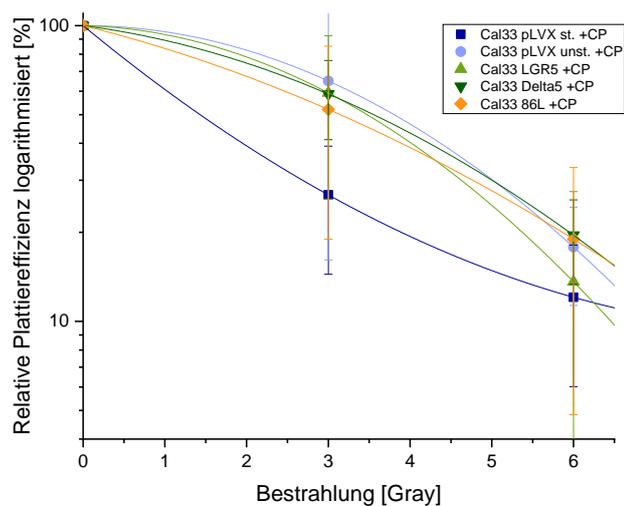
Im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der LGR5 Delta5 überexprimierenden Cal33-Zellen im Anschluss an eine Cisplatinbehandlung eine Steigerung des klonogenen Überlebens um ca. 180% bei 3 Gy ( $p=0,041$ ) und um ca. 100% bei 6 Gy ( $p=0,110$ ) zur Folge.

Für Cal33-Zellen nach LGR5-Knockdown mit gleichem Behandlungsschema wurde das klonogene Zellüberleben um 50% (3 Gy) ( $p=0,152$ ) und um 80% (6 Gy) ( $p=0,049$ ) reduziert.

Im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der Cal33-Zellen mit einem LGR5-Knockdown nach Stimulation im Anschluss an eine Cisplatinbehandlung eine Steigerung des klonogenen Zellüberlebens um ca. 130% (3 Gy) ( $p=0,021$ ) und um ca. 40% (6 Gy) ( $p=0,453$ ) zur Folge.

Die Auswertung der Datensätze zeigte für die Zelllinie Cal33, dass nach vorausgegangener Behandlung mit Cisplatin sowie Stimulation mit Wnt3a und RSPO1, eine Überexpression von LGR5 Delta5 sowie ein LGR5-Knockdown im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle zu einer Radioresistenz führt.

Die Abbildung 17 lässt die Vermutung zu, dass die Stimulierung der Cal33-Zellen (pLVX) mit Wnt3a und RSPO1 die Zellen gegenüber einer Bestrahlung im Anschluss an eine Cisplatintherapie sensitiver macht.



**Abbildung 17: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Cisplatinbehandlung und Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist der linearquadratische Fit der klonogenen Überlebensrate der Zelllinie Cal33 nach Behandlung mit Cisplatin und anschließender Bestrahlung abhängig von der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten. Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle Cal33 pLVX sind alle Zellen 24 h vor der Cisplatinbehandlung und über deren 48 stündige Dauer mit Wnt3a und RSP01 stimuliert worden. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt ( $n \geq 3$ ).

Eine Überexpression von LGR5 Delta5 sowie ein LGR5 Knockdown scheinen diesen sensitivierenden Effekt der Stimulation mit Wnt3a und RSP01 aufzuheben. Eine LGR5 full-length Überexpression führt zu einer weiteren Sensitivierung.

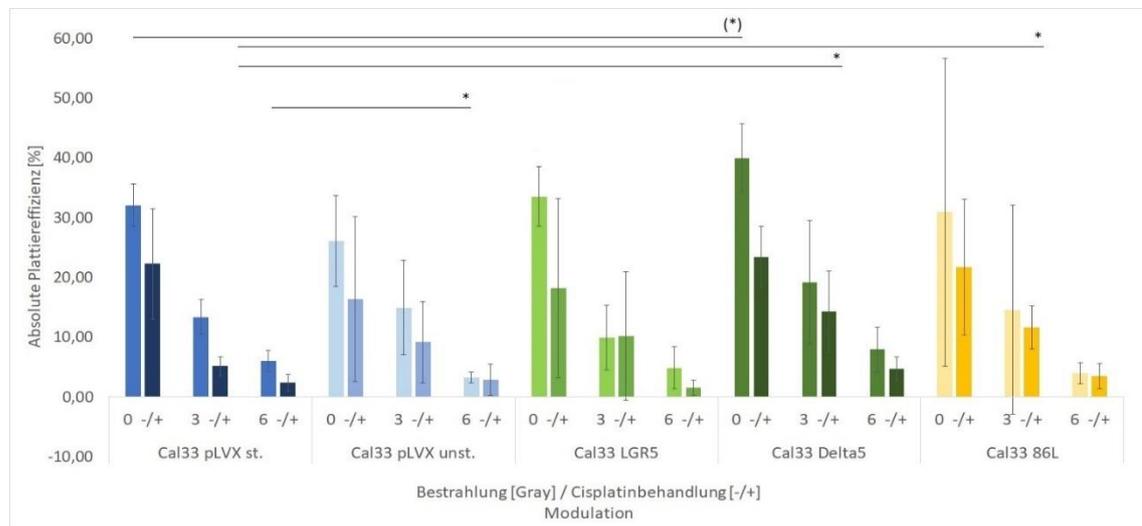
**Tabelle 22: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF<sub>10</sub> [Gy] bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Modulation in der Zelllinie Cal33**

	Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF <sub>10</sub> [Gy]		DMF10
Cal33 pLVX st.	7,3		
Cal33 pLVX unst.	6,9	pLVX st./ pLVX unst.	1,06
Cal33 LGR5	6,5	pLVX st./LGR5	1,12
Cal33 Delta5	7,3	pLVX st./Delta5	1,00
Cal33 86L	7,5	pLVX st./86L	0,97

**Tabelle 23: Verstärkungsfaktor bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung mit 3, bzw. 6 Gy abhängig von der LGR5-Modulation in der Zelllinie Cal33**

	EF 3 Gy	p	EF 6 Gy	p
Cal33 pLVX unst./ pLVX st.	1,79	0,29	1,18	0,78
Cal33 LGR5/pLVX st.	1,98	0,39	0,62	0,37
Cal33 Delta5/ pLVX st.	<b>2,78</b>	<b>0,04</b>	1,94	0,11
Cal33 86L/ pLVX st.	<b>2,27</b>	<b>0,02</b>	1,42	0,45

Bei Betrachtung des DMF10 verhalten sich jedoch nahezu alle Modulationen in etwa gleich. Größere Unterschiede sind nur bei einer geringeren Strahlendosis erkennbar, wie in der Tabelle der Verstärkungsfaktoren nachweisbar.



**Abbildung 18: Klonogenes Überleben nach Cisplatinbehandlung und Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33**

Dargestellt ist die Zusammenfassung aller untersuchten therapeutischen Variationen der Behandlung der Zelllinie Cal33 aller LGR5-Modulationen.

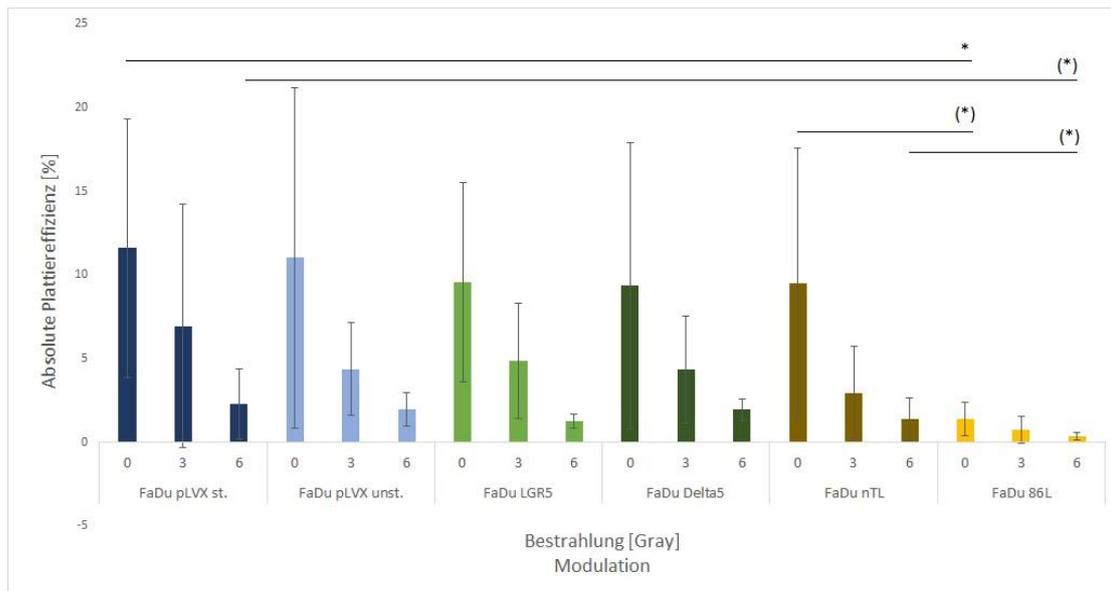
Zusammengefasst ergibt sich für die Zelllinie Cal33 nach Stimulation und somit mäßiger Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges eine tendenziell signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens durch eine LGR5 Delta5-Überexpression ohne Bestrahlung und ohne Cisplatinbehandlung.

Außerdem resultierte nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in der Zelllinie Cal33 pLVX ein signifikant höheres klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zu Cal33 pLVX ohne Stimulation.

Ein signifikanter Effekt auf das klonogene Überleben durch LGR5 full-length- oder LGR5 Delta5-Überexpression, bzw. -Knockdown nach Stimulation und Cisplatinbehandlung im Vergleich zur gleichermaßen behandelten pLVX-Kontrolle konnte nicht gezeigt werden.

Für eine Behandlung mit Cisplatin und anschließender Bestrahlung war für die LGR5 Delta5-Überexpression eine signifikante Radioresistenz bei einer Bestrahlungsdosis von 3 Gy im Vergleich zur pLVX-Kontrolle feststellbar. Diese konnte ebenso für den Knockdown von LGR5 festgestellt werden.

In der Zelllinie FaDu führte die Bestrahlung der stimulierten Leervektorkontrolle pLVX mit 3 Gy im Anschluss an eine Cisplatintherapie zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens um etwa 40% ( $p=0,172$ ), mit 6 Gy um ca. 80% ( $p=0,205$ ).



**Abbildung 19: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist das klonogene Überleben nach Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung abhängig von der Modulation der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu.

Bis auf die mitgeführte unstimulierte Leervektorkontrolle FaDu pLVX sind alle Zellen 24h vor der Cisplatinbehandlung und über deren 48 stündige Dauer, d.h. für 72 h vor der Bestrahlung mit Wnt3a und RSP01 stimuliert worden. Es wurden sieben voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen für jede Modulation in den gezeigten Behandlungen mindestens drei Datensätze erhoben werden konnten ( $n \geq 3$ ).

In der nicht stimulierten Leervektorkontrolle wurde das klonogene Zellüberleben nach 3 Gy und eine Cisplatintherapie um 60% ( $p=0,122$ ), bzw. nach 6 Gy um etwa 80% ( $p=0,088$ ) reduziert.

Im Vergleich zur stimulierten Kontrolle wurde das klonogene Überleben der nicht stimulierten FaDu pLVX-Zellen nach 3 Gy und Cisplatintherapie um 40% ( $p=0,335$ ), bzw. nach 6 Gy um 15% ( $p=0,745$ ) reduziert.

Die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden FaDu-Zellen nach Stimulation und Chemotherapie führte zur Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 50% (3 Gy) ( $p=0,611$ ), bzw. um etwa 90% (6 Gy) ( $p=0,150$ ).

Im Vergleich zu der stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der LGR5 full-length überexprimierenden FaDu-Zellen nach Stimulation und Cisplatinbehandlung eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 30% (3 Gy) ( $p=0,662$ ), bzw. um ca. 45% (6 Gy) ( $p=0,236$ ) zur Folge.

Die Bestrahlung der LGR5 Delta5 überexprimierenden FaDu-Zellen nach Stimulation und Chemotherapie reduzierte das klonogene Zellüberleben um 55% (3 Gy) ( $p=0,382$ ), bzw. um 80% (6 Gy) ( $p=0,265$ ).

Im Vergleich zu der stimulierten pLVX-Kontrolle führte eine Bestrahlung der stimulierten LGR5 Delta5 überexprimierenden FaDu-Zellen nach Cisplatinbehandlung zur Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 40% (3 Gy) ( $p=0,481$ ), bzw. um ca. 15% (6 Gy) ( $p=0,690$ ).

Die nTL-Kontrolle der Zelllinie FaDu war sensitiver als die pLVX-Kontrolle.

Die Bestrahlung der Zellen mit mit nTL-Vektor behandelten Zellen führte nach Stimulation und Cisplatinbehandlung zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 70% (3 Gy) ( $p=0,101$ ), bzw. um etwa 85% (6 Gy) ( $p=0,100$ ).

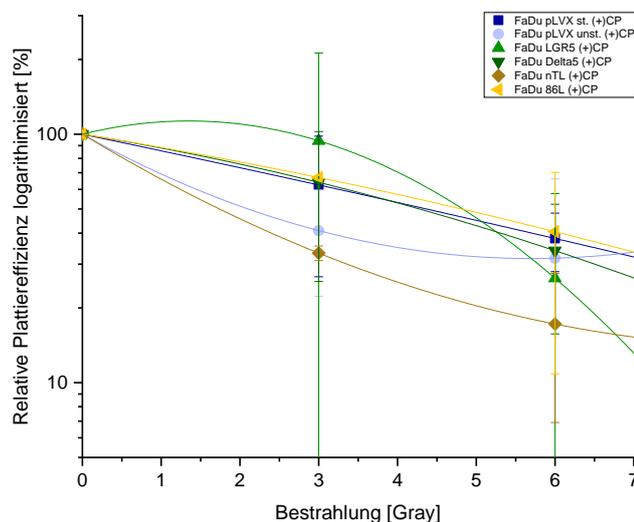
Im Vergleich zu der stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der nTL-Kontrolle nach Stimulation und Cisplatinbehandlung eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 60% (3 Gy) ( $p=0,286$ ), bzw. um ca. 40% (6 Gy) ( $p=0,472$ ) zur Folge.

Die Bestrahlung der FaDu-Zellen mit einem LGR5-Knockdown nach Stimulation und Chemotherapie führte zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 45% (3 Gy) ( $p=0,382$ ), bzw. um 70% (6 Gy) ( $p=0,162$ ).

Im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle hatte die Bestrahlung der FaDu-Zellen mit einem LGR5-Knockdown nach Stimulation und Cisplatinbehandlung eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 90% (3 Gy) ( $p=0,138$ ) bzw. um ca. 80% (6 Gy) ( $p=0,053$ ) zur Folge.

Damit war das klonogene Überleben nach der Bestrahlung mit 6 Gy in Zellen mit LGR5-Knockdown tendenziell signifikant auf ein Fünftel des klonogenen Überlebens von Zellen der stimulierten pLVX-Kontrolle reduziert.

Auch im Vergleich zur nTL-Kontrolle führte ein LGR5 Knockdown zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens der FaDu-Zellen nach Bestrahlung im Anschluss an eine Cisplatinbehandlung, um 75 % nach 3 Gy ( $p=0,170$ ), bzw. um etwa 70% ( $p=0,096$ ) nach 6 Gy.



**Abbildung 20: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Behandlung mit Cisplatin und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist das relative Überleben der Zelllinie FaDu nach Bestrahlung und Cisplatinbehandlung abhängig von der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten. Es wurden mindestens 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei für 3Gy LGR5 und 3Gy 86L nur zwei Werte ( $n=2$ ) zu eruieren waren, für alle anderen waren mindestens drei Werte zu erheben ( $n=3$ ).

Zusammengefasst kann festgestellt werden: Das klonogene Überleben erfuhr nach jeder Modulation durch Bestrahlung mit 3 Gy im Anschluss an eine Cisplatintherapie eine 30-60%ige Reduktion, nach 6 Gy sogar um 70-85%. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (pLVX oder nTL) konnten nicht festgestellt werden.

Tendenziell signifikant war die Verringerung des zellulären Überlebens der FaDu-Zellen mit LGR5-Knockdown nach Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung mit 6 Gy im Vergleich zu stimulierten Zellen mit pLVX-Leervektor und nTL-Vektor nach gleicher Behandlung ( $p_{pLVX/86L}=0,053$ ;  $p_{nTL/86L}=0,096$ ).

In Abbildung 20 wird das Ausmaß der Reduktion in jeder Modulation miteinander verglichen. Die hohe survival fraction der Zellen mit LGR5 full-length Überexpression bei 3Gy wird einerseits durch eine große Schwankung innerhalb der Versuche hervorgerufen. Zudem ist zu berücksichtigen, dass lediglich zwei Messwerte verwendet werden konnten.

Tabelle 244: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF<sub>10</sub> [Gy] bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Modulation in der Zelllinie FaDu

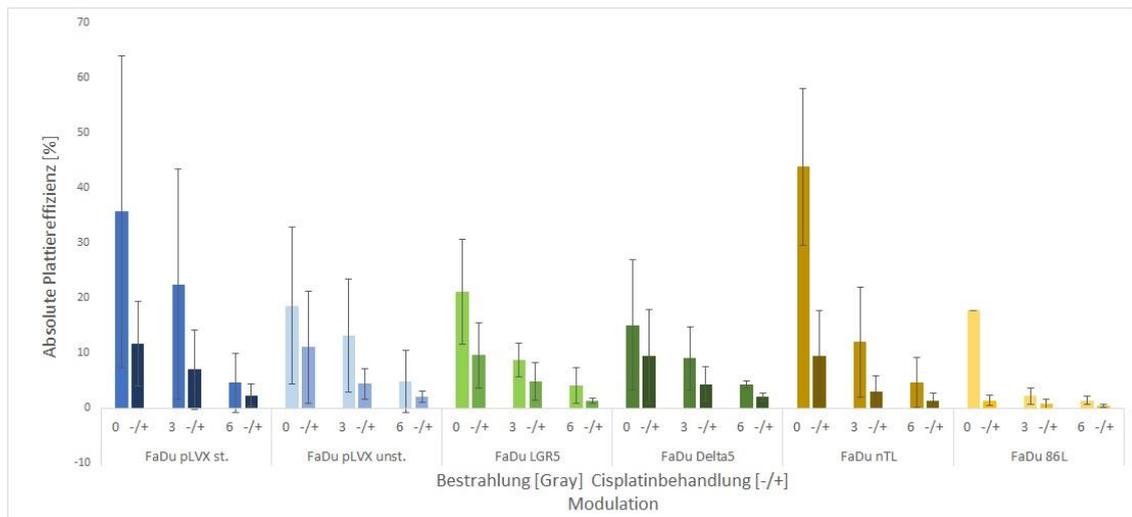
	Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF <sub>10</sub> [Gy]		DMF10
FaDu pLVX st.	13,4		
FaDu pLVX unst.	-*	pLVX st./ pLVX unst.	-*
FaDu LGR5	7,35	pLVX st./LGR5	1,82
FaDu Delta5	10,27	pLVX st./ Delta5	1,30
FaDu nTL	-*	pLVX st./ nTL	-*
FaDu 86L	12,38	pLVX st./ 86L	1,08

\*Dieser Wert konnte nicht kalkuliert werden.

Tabelle 255: Verstärkungsfaktor bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung mit 3, bzw. 6 Gy abhängig von der LGR5-Modulation in der Zelllinie FaDu

	EF 3 Gy	p	EF 6 Gy	p
FaDu pLVX unst./ pLVX st.	0,63	0,44	0,86	0,73
FaDu LGR5/pLVX st.	0,70	0,66	0,56	0,24
FaDu Delta5/ pLVX st.	0,62	0,48	0,85	0,7
FaDu nTL/pLVX st.	0,43	0,29	0,60	0,47
FaDu 86L/pLVX st.	0,11	0,14	0,29	<b>0,05</b>
FaDu 86L/nTL	0,25	0,17	0,29	0,1

Bei Betrachtung des DMF10 und des Verstärkungsfaktors werden o.g. Ergebnisse ebenfalls deutlich.

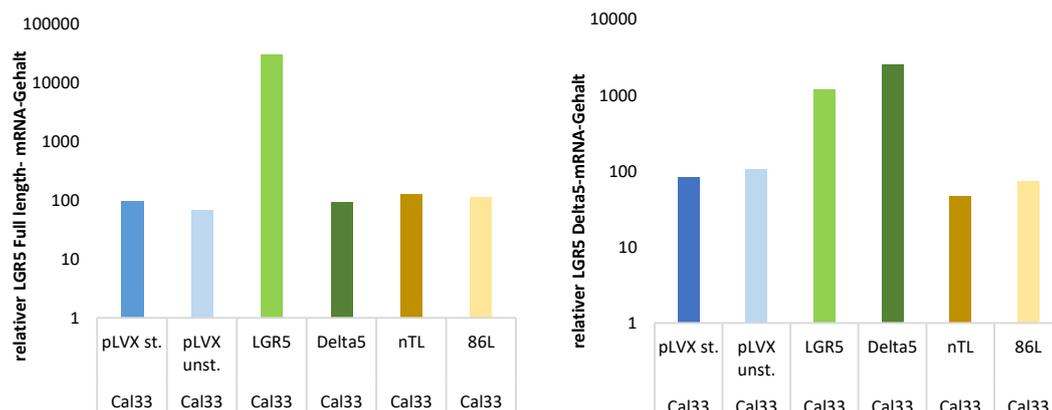


**Abbildung 21: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung aller untersuchten therapeutischen Variationen der Zelllinie FaDu in ihren verschiedenen LGR5-Modulationen.

Zusammengefasst lässt sich für die Zelllinie FaDu unter Stimulation mit Wnt3a und RSP01 und somit mäßiger Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges eine tendenziell signifikante Steigerung der Strahlensensitivität, sowie eine signifikante bzw. tendenziell signifikante Steigerung der Chemosensitivität durch LGR5-Knockdown bezogen auf die stimulierte pLVX- und die stimulierte nTL-Kontrolle feststellen.

#### 4.6. Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR und Westernblot



**Abbildung 22: Relativer mRNA-Gehalt von LGR5 full-length (links) bzw. LGR5 Delta5 (rechts) in der Zelllinie Cal33**

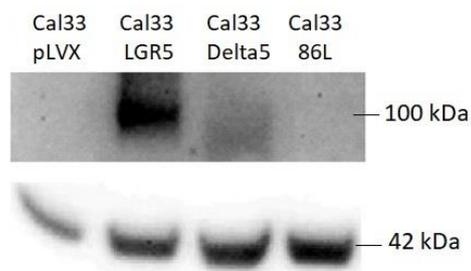
Dargestellt ist der mittels qPCR gemessene relative mRNA-Gehalt von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 nach Behandlung mit den entsprechenden lentiviralen Konstrukten. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta CT$ -Methode, wobei RPL9 als Housekeeping-Gen genutzt und die stimulierte pLVX-Kontrolle als Referenzbehandlung genutzt wurde. Es wurden zwei Messungen biologisch unabhängiger Versuche durchgeführt, von denen das arithmetische Mittel in dieser Abbildung gezeigt ist.

Vor Beginn (Daten nicht gezeigt), sowie nach Abschluss der Hauptversuche erfolgte die Durchführung einer quantitativen Realtime-PCR um die Überexpression von LGR5 full-length bzw. Delta5 zu überprüfen.

Der deutlich erhöhte Nachweis der LGR5 full-length mRNA in der Zellkultur Cal33 LGR5 full-length (Abb. 22 links) bestätigt einen erhöhten Gehalt von LGR5 full-length im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zellmodifikationen der Zelllinie Cal33 ausschließlich in dieser Modifikation.

In der Zellkultur Cal33 Delta5 (Abb. 22 rechts) konnte ein erhöhter mRNA-Level von LGR5 Delta5 gezeigt werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen LGR5 full-length und LGR5 Delta5 erkennen die Primer für LGR5 Delta 5 jedoch auch zu einem geringen Anteil LGR5 full-length, was in einem vermeintlichen Anstieg an dieser Stelle resultierte.

Der Knockdown von LGR5 ist nicht eindeutig zu erkennen, was darin begründet liegt, dass sich die Werte für die pLVX-Kontrollen bereits nah an der Nachweisgrenze befinden.



**Abbildung 23: LGR5-Expression auf Proteinebene in den verschiedenen LGR5-Modulationen in der Zelllinie Cal33**

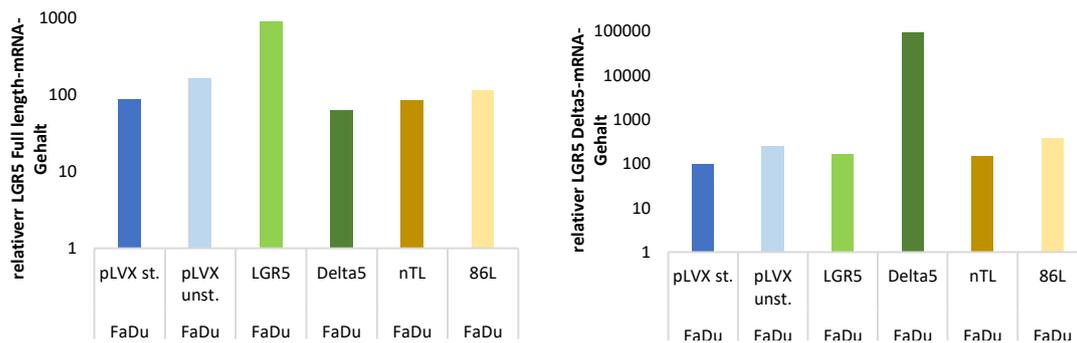
Dargestellt sind das Ergebnis eines Westernblots zum Nachweis von LGR5 full-length und LGR5 Delta5 (ca. 100kDa), sowie die dazugehörige  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle (ca. 42kDa) in den verschiedenen LGR5-Modulationen der Zelllinie Cal33.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch den Proteinnachweis von LGR5 full-length, bzw. LGR5 Delta5 in den verschiedenen LGR5-Modulationen in der Zelllinie Cal33.

In der Kontrolle Cal33 pLVX, sowie in den Zellen mit LGR5-Knockdown (86L) konnte kein LGR5-Protein nachgewiesen werden.

In den Zellen mit LGR5 full-length-Überexpression ist eine deutliche Bande bei 100 kDa zu sehen, welche der erwarteten LGR5 full-length Bande entspricht.

In den Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression ist eine Proteinbande nachweisbar, welche kleiner als 100 kDa ist. Diese entspricht der erwarteten Spleißvariante LGR5 Delta5.



**Abbildung 24: Relativer mRNA-Gehalt von LGR5 full-length (links) bzw. LGR5 Delta5 (rechts) in der Zelllinie FaDu**

Dargestellt ist der mittels qPCR gemessene relative mRNA-Gehalt von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 abhängig von der Behandlung mit den entsprechenden lentiviralen Konstrukten. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wobei RPL9 als Housekeeping-Gen genutzt und die stimulierte pLVX-Kontrolle als Referenzbehandlung genutzt wurde. Es wurden zwei Messungen biologisch unabhängiger Versuche durchgeführt, von denen das arithmetische Mittel in dieser Abbildung gezeigt ist.

Der Nachweis der LGR5 full-length mRNA in der Zelllinie FaDu full-length bestätigte ein erhöhtes LGR5 full-length mRNA-Level im Vergleich zu allen anderen Modulationen in ausschließlich dieser Zellkultur.

In der Zellkultur FaDu Delta5 konnte ein deutlich erhöhter mRNA-Level von LGR5 Delta5 im Vergleich zur pLVX-Kontrolle und allen anderen Modulationen gezeigt werden.

Der Knockdown von LGR5 ist auf mRNA-Niveau nicht nachweisbar, was darin begründet liegt, dass sich die Werte für die pLVX-Kontrollen bereits nah an der Nachweisgrenze befinden.

Ein Nachweis auf Proteinebene via Westernblot war in der Zelllinie FaDu leider nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Dies war auch schon in der Vorarbeit von Sarah Luiken der Fall.

#### 4.7. Expression tumorassoziierter Marker in Abhängigkeit der LGR5-Modulation und therapeutischen Behandlung

Im Anschluss an die Hauptversuche sollte der Effekt der LGR5-Modulation und die Auswirkung der verschiedenen therapeutischen Maßnahmen auf die mRNA-Synthese diverser tumorrelevanter Gene untersucht werden. Hierfür wurden Zellen jeder LGR5-Modulation, welche bei der Durchführung des Zellkoloniebildungstests beider Zelllinien nicht benötigt wurden, eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese aufgetaut, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und verschiedene qPCR-Messungen durchgeführt (s. Kapitel 2.7.1.-2.7.3.). Als Housekeeping-Gen wurde RPL9 verwendet (Jonge *et al.*, 2007).

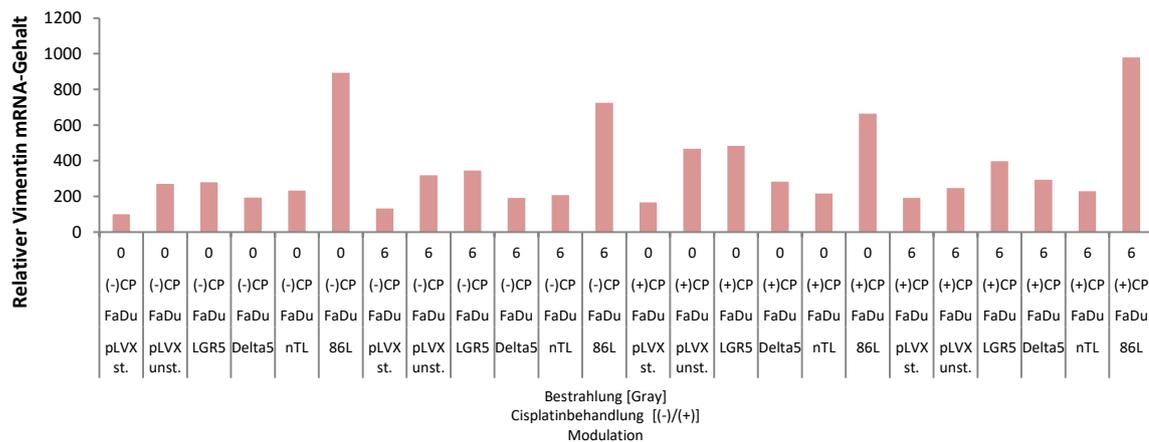
Insgesamt wurden 10 Gene auf ihre RNA-Expression hin untersucht, wobei für zwei dieser Gene in beiden Zelllinien kein Effekt einer modifizierten LGR5-Expression auf deren mRNA-Level zu

eruierten war. Dies war der Fall für MDM2 und ABCB1 (Daten nicht gezeigt).

Außerdem kam es zu einigen Ausfällen von Proben, besonders bei Cal33 pLVX st. und LGR5 full-length.

Wurde ein Effekt nur in einer Zelllinie festgestellt, werden die Daten nur für diese gezeigt. In diesen Fällen waren in der nicht gezeigten Zelllinie keine Effekte der Modulation der LGR5-Expression auf den mRNA-Level der verschiedenen Gene zu sehen.

#### 4.7.1. Vimentin



**Abbildung 25: Relativer mRNA-Gehalt an Vimentin in der Zelllinie FaDu abhängig von Modulation der LGR5-Expression ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.**

Dargestellt ist das Ergebnis einer quantitativen PCR, in der der relative mRNA-Gehalt von Vimentin in der Zelllinie FaDu gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Es wurden zwei Messungen biologisch unabhängiger Versuche durchgeführt, von denen das arithmetische Mittel in dieser Abbildung gezeigt ist.

In der Zelllinie FaDu war für die stimulierte pLVX-Kontrolle nur ein sehr geringer relativer Vimentin mRNA-Gehalt messbar, der sich nach Bestrahlung und Cisplatintherapie in den Zellen etwas erhöht und nach einer Kombination beider Therapien ungefähr verdoppelte.

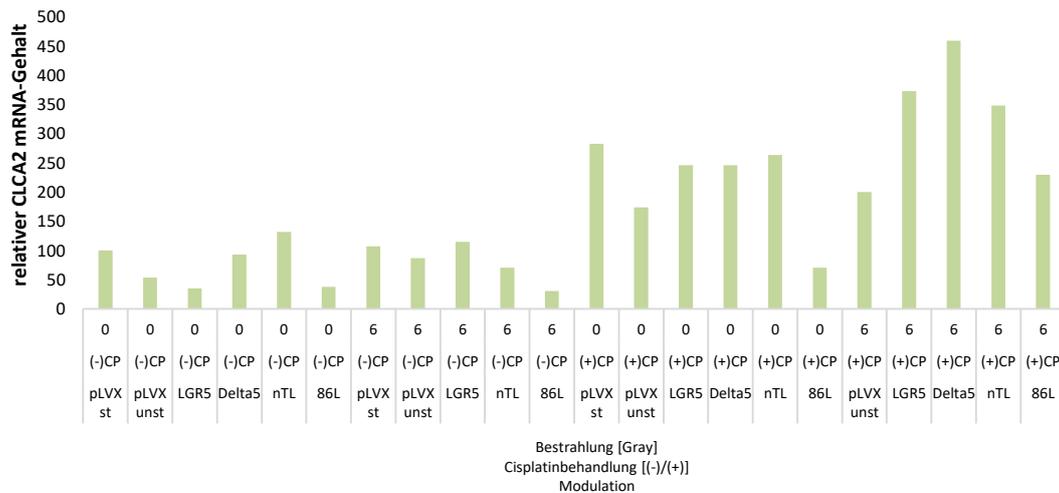
In der unstimulierten Kontrolle ist eine deutliche Steigerung der Expression von Vimentin auf mRNA-Ebene bei alleiniger Cisplatintherapie zu erkennen, in Kombination mit Bestrahlung fällt diese wieder ab.

Auch bei FaDu-Zellen mit LGR5 full-length-Überexpression war die höchste Expression von Vimentin bei isolierter Cisplatintherapie zu sehen.

Die Überexpression von LGR5 Delta5 führte insgesamt zu einer geringeren mRNA-Synthese von Vimentin, die durch Cisplatintherapie geringfügig gesteigert wurde. Die nTL-Kontrolle verhielt sich in etwa wie die stimulierte pLVX-Kontrolle.

Am auffälligsten war jedoch die deutliche Erhöhung des Vimentin mRNA-Gehalts in der LGR5-Knockdown-Modulation FaDu 86L in jeder Therapievariation im Vergleich zu allen anderen Modulationen auf das Doppelte bis Neunfache.

## 4.7.2. CLCA2

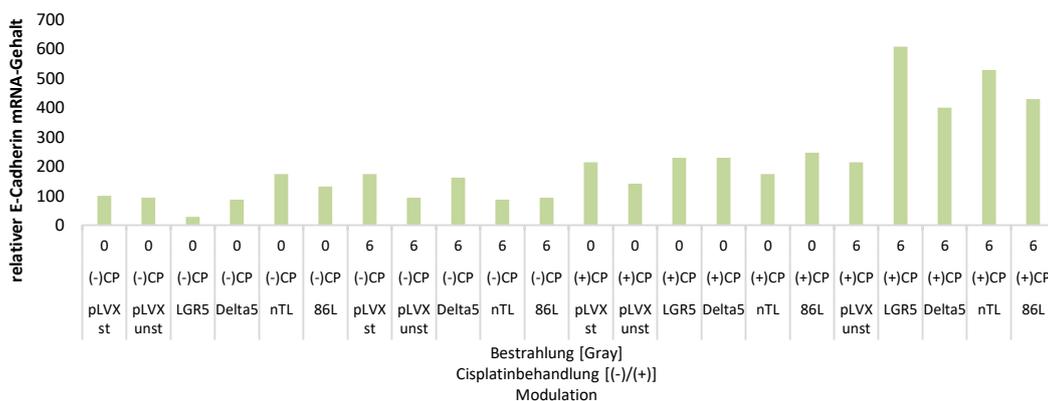


**Abbildung 26: Relativer mRNA-Gehalt an CLCA2 in der Zelllinie Cal33 abhängig von der Modulation der LGR5-Expression ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.**

Dargestellt ist das Ergebnis einer quantitativen PCR, in der der relative mRNA-Gehalt von CLCA2 in der Zelllinie Cal33 gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Es wurde eine Messung als technisches Duplikat durchgeführt.

Bei der Untersuchung des mRNA-Levels von CLCA2 in der Zelllinie Cal33 fiel auf, dass es in fast jeder LGR5-Modulation, bis auf den Knockdown 86L nach Cisplatintherapie zu einer deutlichen Steigerung (Verdoppelung bis Vervierfachung) der CLCA2 mRNA-Gehalt kam. Ebenso und noch stärker war dieser Effekt bei der kombinierten Behandlung mit Cisplatintherapie und Bestrahlung zu sehen, in diesem Fall auch beim LGR5-Knockdown 86L.

## 4.7.3. E-Cadherin



**Abbildung 27: Relativer mRNA-Gehalt an E-Cadherin in der Zelllinie Cal33 abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.**

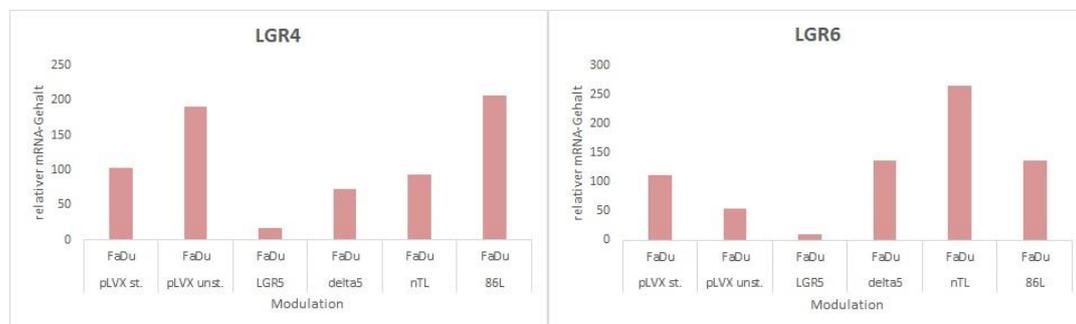
Dargestellt ist das Ergebnis einer quantitativen PCR, in der der relative mRNA-Gehalt von E-Cadherin in der Zelllinie Cal33 gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Es wurde eine Messung als technisches Duplikat durchgeführt.

Auch bei der Untersuchung des mRNA-Levels von E-Cadherin in der Zelllinie Cal33 war eine deutliche Steigerung in jeder LGR5-Modulation nach Cisplatintherapie und Bestrahlung zu verzeichnen, wobei die Kombination beider Therapien sich besonders positiv auf die mRNA-Level von E-Cadherin auswirkten. Im Vergleich zur Kontrolle fand eine Verdoppelung bis Verdreifachung statt.

#### 4.8. Expression Wnt-Signaling assoziierter Gene abhängig von der LGR5-Modulation

Für die Untersuchung des Wnt Signaling wurden die Gene LGR4, LGR6 und Wnt3a gemessen. Nur Ergebnisse, in denen ein Effekt sichtbar war, werden gezeigt.

##### 4.8.1. LGR4 und LGR6



**Abbildung 28, 29: Relativer mRNA-Gehalt von LGR4 und LGR6 in der Zelllinie FaDu abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Chemo- oder Radiotherapie.**

Dargestellt ist jeweils das Ergebnis einer quantitativen PCR, in der der relative mRNA-Gehalt von LGR4, bzw. LGR6 in den Zellkulturen mit FaDu gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Es wurde jeweils eine Messung als technisches Duplikat durchgeführt.

Bei der Untersuchung des mRNA-Gehalts von LGR4 zeigte sich in der Zelllinie FaDu im Vergleich der pLVX-Kontrollen eine Verdopplung des mRNA-Levels von LGR4 bei fehlender Stimulation. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach Stimulation in der Zelllinie mit LGR5-Knockdown FaDu 86L im Vergleich zur stimulierten Leervektorkontrolle.

In der Untersuchung des mRNA-Gehalts von LGR6 war im Gegensatz dazu im Vergleich der pLVX-Leervektor-Kontrollen durch die fehlende Stimulierung mit Wnt3a und RSPO1 eine Halbierung des mRNA-Gehalts feststellbar.

Die Überexpression von LGR5 full-length führte in der Zelllinie FaDu zu einer Verringerung des mRNA-Levels von LGR4 im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle um etwa 80% und von LGR6 um etwa 90%.

Die Überexpression von LGR5 Delta5 bzw. der nTL-Leervektor hatten im Vergleich zur

stimulierten pLVX-Kontrolle keinen nennenswerten Einfluss auf die LGR4-mRNA-Synthese.

Auf die LGR6-mRNA-Synthese wirkten sich die LGR5 Delta5-Überexpression sowie der LGR5-Knockdown in der Zelllinie FaDu im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls kaum aus. In der Zelllinie mit nTL-Leervektor war eine Verdoppelung der LGR6-mRNA-Synthese im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle feststellbar.

In der Zelllinie Cal33 waren keine Effekte der Modulation der LGR5-Expression auf den mRNA-Level von LGR4 oder LGR6 feststellbar.

#### 4.8.2. Wnt3a



**Abbildung 30, 31: Relativer mRNA-Gehalt von Wnt3a in der Zelllinie Cal33 sowie FaDu abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Chemo- oder Radiotherapie.**

Dargestellt ist das Ergebnis einer quantitativen PCR, in der der relative mRNA-Gehalt von Wnt3a in der Zelllinie FaDu und Cal33 gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Es wurde eine Messung durchgeführt.

Bei der Untersuchung des mRNA-Levels von Wnt3a in der Zelllinie Cal33 ist auffällig, dass bei LGR5-Knockdown der mRNA-Level deutlich herunter reguliert ist im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle. Die fehlende Stimulation sowie die Überexpression von LGR5 Delta5 haben ebenso eine geringe Reduktion des Wnt3a-RNA-Levels im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle zur Folge. Die Zellen mit nTL-Vektor verhalten sich wie die der stimulierten pLVX-Kontrolle. Die Auswirkung von LGR5-Überexpression in der Zelllinie Cal33 wurde untersucht, es konnte jedoch kein Ergebnis kalkuliert werden (Daten nicht gezeigt).

In der Zelllinie FaDu kam es ohne Stimulation zu einem erhöhten mRNA-Level von Wnt3a, ebenso wie nach einem Knockdown von LGR5 im Vergleich zur stimulierten pLVX-Kontrolle.

Die Überexpression von LGR5 Full length führte in FaDu-Zellen zu einer starken Reduktion des mRNA-Gehalts von Wnt3a, die Überexpression von LGR5 Delta5 hingegen nur zu einer geringen Senkung. Vergleicht man beide stimulierten Kontrollen pLVX und nTL, ist kein Unterschied erkennbar.

---

## 5. Diskussion

### 5.1. Optimale Konzentration für eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den Zelllinien FaDu und Cal33

Die TOPFlash-Assay-Methode für die hier untersuchten Zelllinien wurde in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe etabliert (Luiken, 2015). Dabei erwies sich die Wahl des Transfektionsreagens als schwierig. Ziel war es, ein Transfektionsmittel mit möglichst starker Transfektionseffizienz und niedriger Toxizität zu finden. Nach Untersuchung verschiedener Transfektionsmittel wurde nach den beschriebenen Kriterien das Transfektionsreagenz ViaFect™ (Promega) für die Kopf-Hals-Tumorzelllinien Cal33 und FaDu ausgewählt. Dabei wurde eine deutliche Aktivierung (Verzehnfachung) des Wnt-Signal-Weges durch die jeweiligen Konzentrationen 150 ng/ml Wnt3a und RSPO1 gezeigt.

In meiner Arbeit sollten Konzentrationen für Wnt3a und RSPO1 gefunden werden, die in einer mäßigen Aktivierung des Signalweges resultieren. Um die eventuelle zusätzliche Stimulation durch im FKS enthaltene Liganden weitgehend auszuschalten, wurde während der Stimulation RPMI-Medium mit nur 1% FKS-Anteil anstelle der üblichen 10% verwendet. FKS weist eine nicht standardisierte Zusammensetzung auf, ist jedoch für die Proliferation von Zellen in Kultur von großer Bedeutung, weshalb kein serumfreies Medium genutzt werden konnte. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass das Einstreuen und die Transfektion in Medium mit 10% FKS-Anteil und die Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in Medium mit 1% FKS-Anteil durchgeführt werden kann, ohne eine messbare Aktivierung des Wnt-Signalweges im TOPFlash-Assay zur Folge zu haben.

Die Auswahl der zu testenden Wnt3a- und RSPO1-Konzentrationen für eine mäßige Aktivierung des Wnt-Signalweges erfolgte auf der Basis der Messwerte aus den Vorversuchen der Arbeitsgruppe. Problematisch zeigten sich während der Versuche die hohen Schwankungen der Lumineszenz-Messwerte beider Zelllinien, wobei eine genaue Ursache dafür nicht festgestellt werden konnte. Trotz relativ hoher Standardabweichungen wurden nach fünf durchgeführten Vorversuchen für beide Zelllinien die Konzentration 25 ng/ml für Wnt3a und RSPO1 ausgewählt. Die Steigerung der Aktivität des Signalweges war in FaDu-Zellen etwas stärker als bei Cal33-Zellen. Dies könnte als Ursache haben, dass eine Kostimulation des Signalweges in der FaDu-Zelllinie zu einem synergistischen Effekt führt, der auch bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Carmon *et al.*, 2011; Glinka *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2011). In der Zelllinie Cal33 ist generell eine Kostimulation notwendig um eine Aktivitätssteigerung zu erzielen (Luiken, 2015). In allen Assays wurden jeweils die pLVX-Kontrollen beider Zelllinien untersucht.

## 5.2. Ermittlung des IC50-Wertes für Cisplatin

Der IC50-Wert gibt die Konzentration einer Substanz an, bei der 50% eines Enzyms, eines Rezeptors oder auch das klonogene Überleben von Zellen *in-vitro* inhibiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der IC50-Wert der Cisplatin-Konzentration gesucht, bei dem das klonogene Überleben der Zelllinien Cal33 und FaDu um 50% sinkt. Hierzu führte ich zunächst in Vorversuchen Koloniebildungstests mit Cisplatin-Konzentrationen von 0,5-20  $\mu\text{M}$  durch. Über mehrere Vorversuche wurden die Konzentrationen angepasst und anschließend drei Hauptversuche mit Cisplatin-Konzentrationen von 0,5-5,5  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Dabei zeigten sich FaDu-Zellen empfindlicher gegenüber der Chemotherapie. Eine mögliche Erklärung wäre die stärkere Aktivität des intrinsischen Wnt-Signalwegs in der Zelllinie FaDu im Vergleich zu Cal33 (Luiken, 2015) und die damit verbundene stärkere Proliferation (Polakis, 2000; Reya and Clevers, 2005). Proliferierende, sich teilende Zellen sind durch Chemotherapie besser angreifbar als Zellen, welche nur eine geringe bis keine Teilungsrate mehr aufweisen (Frederick S. Philips *et al.*, 1967). Demzufolge könnte eine höhere Zellteilungsrate der FaDu-Zelllinie für die stärkere Empfindlichkeit gegenüber der Therapie mit Cisplatin ursächlich sein.

## 5.3. Effekt der Behandlung mit lentiviralen Konstrukten auf das klonogene Überleben

Das Wachstumsverhalten verschiedener Kopf-Hals-Tumorzelllinien mit veränderter LGR5-Expression wurde bereits in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe (Luiken, 2015) untersucht. Damals fanden diese Experimente jedoch ohne Zusatz von exogenem Wnt3a und RSPO1 statt. In meiner Arbeit sollte der Einfluss einer definierten Stimulierung mit Wnt3a und RSPO1 auf das klonogene Überleben zweier Tumorzelllinien mit veränderter LGR5-Expression untersucht werden. Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch diese Stimulation wurde bereits in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe gezeigt (Luiken, 2015).

Unter der Zugabe einer Konzentration der beiden Faktoren Wnt3a und RSPO1, die zu Beginn der Untersuchungen in TOPFlash-Assay-Versuchen für eine mäßigen Aktivierung des Signalweges bestimmt wurde (s. 4.2.), verhielten sich alle LGR5-Modulationen der Zelllinien Cal33 und FaDu ebenso wie in den Vorversuchen der Arbeitsgruppe ohne Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 (Luiken, 2015).

Die Effekte einer veränderten LGR5-Expression auf das klonogene Langzeitüberleben waren zelllinienabhängig. Sowohl ohne Stimulation (Luiken, 2015) als auch mit Stimulation mit Wnt3a und RSPO1, kam es in der Zelllinie Cal33 zu einer Erhöhung des klonogenen Überlebens, wenn eine Überexpression der Spleißvariante LGR5 Delta5 auf mRNA-Ebene vorlag. Diese Effekte wurden in dieser Arbeit tendenziell signifikant nachgewiesen. So zeigte

sich, dass Cal33-Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression nach dem Einstreuen häufiger teilungsfähig blieben als Zellen der Kontrolle.

Alle anderen LGR5-Modulationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu ihren Kontrollen hinsichtlich der Klonogenität, sowohl in der Zelllinie Cal33, als auch in der Zelllinie FaDu.

Ebenfalls in der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Korrelation zwischen erhöhten LGR5 Delta5-mRNA-Leveln mit einer verschlechterten Prognose von Patienten mit OSCC nachgewiesen (Rot *et al.*, 2019). Das in dieser Arbeit festgestellte erhöhte klonogene Überleben von Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression lässt sich gut mit dieser Aussage vereinen.

2016 führte die Arbeitsgruppe um Osawa erstmals Versuche zum Verhalten von sowohl LGR5 full-length-positiven, als auch Zellen mit Expression der Spleißvarianten LGR5 Delta5 und LGR5 Delta5-8 unter Chemotherapie an kolorektalen Karzinomzellen durch. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Spleißvariante LGR5 Delta 5 auf Proteinebene eher während eines aktiven Zellzyklus nachzuweisen war, während LGR5 full-length vor allem im Zyklusarrest gezeigt werden konnten. Außerdem wurden Zellen mit LGR5 full-length-Überexpression negativ für den Proliferationsmarker Ki-67 getestet, Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression positiv. Die Studie zeigte, dass LGR5 full-length in CRC-Zellen zwar als Stammzellmarker dient, eine Proliferationssteigerung jedoch eher durch Überexpression von LGR5 Delta5 zustande kommt (Osawa *et al.*, 2016). Das in meiner Arbeit festgestellte erhöhte klonogene Überleben von Cal33-Zellen mit Überexpression von LGR5 Delta5 scheint somit plausibel.

Andere Arbeiten zeigten jedoch auch eine proliferationssteigernde Wirkung durch LGR5 (Q. Chen *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Wang and Liu, 2015). Eine Unterscheidung zwischen LGR5 full-length und Spleißvarianten wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht vorgenommen.

#### 5.4. Einfluss einer veränderten LGR5-Expression auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität der Zelllinien Cal33 und FaDu nach Stimulierung mit Wnt3a und RSPO1

Basierend auf Studien, in denen gezeigt wurde, dass LGR5 und seine Rolle im Wnt-Signalweg in Verbindung mit Liganden wie RSPO1-4 (Carmon *et al.*, 2011) einen Einfluss auf die Karzinogenese und Metastasierung diverser Krebsarten (Bienz and Clevers, 2000; Q. Chen *et al.*, 2014; Dalley *et al.*, 2015), sowie einen Einfluss auf das therapeutische Ansprechen (Hsu *et al.*, 2013) und die Prognose von Krebserkrankungen (Rot *et al.*, 2019) haben, stellte sich seit Jahren die Frage, ob LGR5, ein Mediator des Wnt-Signalwegs (Glinka *et al.*, 2011), als therapeutisches Target dienen könnte. Bisherige Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigten,

---

dass eine veränderte LGR5-Expression einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten diverser Karzinom-Zelllinien, u.a. der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu und der Zungenkarzinom-Zelllinie Cal33 nach Bestrahlung hat (Luiken, 2015). Angelehnt an im klinischen Alltag übliche Therapieverfahren (S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom) sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich eine Modulation der LGR5-Expression auf das Verhalten der Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien Cal33 und FaDu gegenüber isolierter Cisplatinbehandlung bzw. Radiotherapie sowie einer Kombinationstherapie aus Cisplatin mit anschließender Bestrahlung bei einer mäßigen Aktivierung des Wnt-Signalweges mittels RSPO1 (Carmon *et al.*, 2011; Ruffner *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2014) und Wnt3a (Samarzija *et al.*, 2009) auswirkt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Sarah Luiken, in denen für eine Überexpression von LGR5 full-length in der in der Zelllinie Cal33 kein eindeutiger Effekt einer Bestrahlung bestimmt werden konnte, war in meiner Arbeit eine tendenziell signifikante Senkung der survival fraction durch Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

Die Reaktion von Tumorzellen auf eine Radiotherapie ist von unterschiedlichsten Faktoren abhängig. Im soliden Tumor spielen sowohl Lage, Typ, Größe und Differenzierungsgrad, sowie auch z.B. der Anteil hypoxischer Zellen eine Rolle (Gatenby *et al.*, 1988; Graeber *et al.*, 1996). Zellulär betrachtet ist es vor allem von Bedeutung, in welcher Zellzyklusphase die Zelle sich während der Radiotherapie befindet, denn alle Zellzyklusphasen zeigen eine unterschiedliche Strahlensensitivität (Sinclair, 1968).

Für eine Reduktion der Survival Fraction in den Bestrahlungsversuchen unter Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 bei Überexpression von LGR5 full-length in der Zelllinie Cal33 könnte somit eine durch die Aktivierung der Wnt-Kaskade gesteigerte Proliferationsrate und die damit verbundene höhere Zahl von Zellen in der strahlensensitiven Mitosephase des Zellzyklus verantwortlich sein.

Bereits 2015 zeigte sich anhand von Analysen zu dieser Problematik in der eigenen Arbeitsgruppe eine tendenziell signifikant erhöhte Strahlenresistenz der Cal33-Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression. Nach Stimulation konnte dies in dieser Arbeit nach alleiniger Strahlentherapie nicht gezeigt werden. Die Kombinationstherapie aus Cisplatinbehandlung und Bestrahlung führte bei einer Cisplatinkonzentration (mit 1,3  $\mu\text{M}$ ) und Bestrahlung (3 Gy) bei Cal33-Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression und LGR5-Knockdown (86L) zu einem tendenziell signifikant bzw. signifikant erhöhten klonogenen Überleben verglichen mit der Kontrolle.

Die LGR5 Delta5-Variante weist eine Deletion in der Ligandenbindestelle auf, dies sollte die Bindung des Liganden R-Spondine an den Rezeptor LGR5 Delta5 erschweren. Somit ist zu erwarten, dass eine Überexpression der LGR5 Delta5-Variante sich ähnlich einem LGR5-Knockdown auf das zellbiologische Verhalten auswirkt. In beiden Fällen sollte eine

---

Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Wnt3a und RSPO1 ineffizient sein, was durchaus in einer geringeren Proliferationsrate, verglichen mit der Leervektorkontrolle, und damit in einer erhöhten Anzahl von strahlen- und chemoresistenten G1-Zellen resultieren würde.

Eine Erhöhung der Wnt-Signalweg-Aktivität durch eine Überexpression von LGR5 Delta5 und einer daraus folgend zu vermutenden Sensitivierung gegenüber Radio- und/oder Chemotherapie durch eine verstärkte Proliferation und damit erhöhte Anzahl in der Mitosephase befindlicher Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden (Osawa *et al.*, 2016).

In der Zelllinie FaDu war der für die Zelllinie Cal33 beschriebene Effekt in umgekehrter Art und Weise nachweisbar. Ein LGR5-Knockdown führte zu einer tendenziell signifikant bis signifikant nachweisbaren Radiosensitivierung sowohl bei isolierter Bestrahlung als auch bei Kombinationstherapie mit Cisplatin. Ebenfalls war eine Chemosensitivierung im Vergleich zur Kontrolle bei den LGR5-Knockdown-Zellen nachzuweisen.

Eine Überexpression von LGR5 full-length oder LGR5 Delta5 führte jedoch zu keinen signifikanten Änderungen hinsichtlich der Sensitivität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

In der Literatur sind insgesamt widersprüchliche Aussagen zu finden. Nach Entdeckung der R-Spondine als Liganden für LGR5 und der Erkenntnis, dass LGR5 mit den Inhibitoren der Wnt-Kaskade RNF43 und ZRN3 interagiert, galt eine Wnt-Signalweg-Aktivitätssteigerung durch LGR5 und eine dadurch hervorgerufene Proliferationssteigerung als Konsens (Lau *et al.*, 2011; Carmon *et al.*, 2011; Ruffner *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2014). Speziell in Tumoren und Tumorzelllinien wurde eine erhöhte LGR5-Expression mit einer erhöhten Wnt-Aktivität bzw. einer Deregulation der Kaskade in Verbindung gebracht (McClanahan *et al.*, 2006; Yamanoi *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2010), was für eine bessere Angreifbarkeit durch zytotoxische Therapien wie Bestrahlung und Chemotherapie sprechen würde.

Gleichzeitig häuften sich Nachweise, dass LGR5 als Tumorstammzellmarker genutzt werden kann und dass eine Expression dieses Rezeptors in Tumorzellen verantwortlich für eine schlechtere Prognose und höhere Rezidivraten ist (Wu *et al.*, 2012; Nakata *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Rot *et al.*, 2019).

Neben den bereits zuvor beschriebenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Osawa 2016 (Osawa *et al.*, 2016) (s. 5.3.), konnte in besagter Studie gezeigt werden, dass im Vergleich von Zellen vor und nach Chemotherapie, post-chemotherapeutisch signifikant höhere LGR5 full-length Populationen vorhanden waren, der Anteil von Zellen mit einer Überexpression von LGR5-Spleißvarianten jedoch nicht anstieg. In Konklusion sprach dies für eine Resistenzerhöhung gegenüber Chemotherapie in den wenig proliferierenden LGR5 full-length überexprimierenden CRC-Zellen (Osawa *et al.*, 2016).

---

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie FaDu zeigte ein ähnliches Verhalten. Zwar war in FaDu keine Resistenzerhöhung durch LGR5 full-length-Überexpression nachzuweisen, jedoch sowohl eine Radiosensitivierung als auch eine Chemosensitivierung nach LGR5-Knockdown. Diesen Effekt nach Bestrahlung konnte auch Sarah Luiken in ihrer Arbeit zeigen (Luiken, 2015).

Das bessere Ansprechen auf Chemotherapie durch eine geringe LGR5 full-length-Expression findet sich ebenfalls in den Ergebnissen der Forschung der Arbeitsgruppe um Hsu aus dem Jahr 2013 wieder. In dieser Studie wurden Tumorproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom hinsichtlich der Expression von LGR5 untersucht. Darunter waren auch Proben von Patienten, welche mit 5-FU-basierter Therapie behandelt wurden. Unter den mit Chemotherapie behandelten Patienten, konnte eine höhere Ansprechrate auf die Therapie bei Tumoren mit niedrigen LGR5-Expressionsleveln gezeigt werden und eine erhöhte Resistenz bei Tumoren mit hoher LGR5-Expression (Hsu *et al.*, 2013). Verglichen mit den Ergebnissen für die Zelllinie FaDu in der vorliegenden Arbeit konnte die Arbeitsgruppe um Hsu in der Zellkultur ebenfalls ähnliche Ergebnisse feststellen. Ein Knockdown von LGR5 unterdrückte in den untersuchten CRC-Zellen die Proliferation und senkte das klonogene Überleben, während sich Apoptosevorgänge steigerten und eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie festgestellt werden konnte (Hsu *et al.*, 2013).

Die Reduktion der survival fraction von Cal33-Zellen mit LGR5 full-length-Überexpression durch Bestrahlung, ebenso wie die Resistenzerhöhung der LGR5-Knockdown- und LGR5 Delta5-Überexpression-Linien nach Kombinationstherapie, spricht eher für ein entgegengesetztes Verhalten im Vergleich zu kolorektalen Karzinomzellen. Diese Aussage für Zellen der Zungenkarzinomlinie Cal33 wird auch durch die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zur Assoziation zwischen erhöhtem LGR5 Delta5-mRNA-Level und verschlechterter Prognose für Patienten mit OSCC gestützt (Rot *et al.*, 2019).

Die kalkulierte Radioresistenz nach LGR5-Knockdown mit shRNA 86L sowie nach Überexpression mit LGR5 Delta5 ergab sich nach Analyse mit dem Programm Origin, berechnet mit der Funktion Expec Fit verglichen mit der stimulierten Kontrolle pLVX. Anhand des gefitteten Kurvenverlaufs konnten die entsprechenden Aussagen berechnet werden. Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass lediglich zwei Bestrahlungspunkte (3 sowie 6Gy) für diese Analyse genutzt werden konnten. Man sollte diese Analysen nochmals kritisch mit mehreren Messpunkten wiederholen, um diese tendenziellen Effekte zu verifizieren.

Die gefitteten Kurvenverläufe in der Zelllinie Cal33 für die Zellen mit LGR5-Überexpression in Abbildung 11 sowie für die Zellen der Kontrolle pLVX in Abbildung 17, als die Kurvenverläufe in der Zelllinie FaDu für die Zellen mit LGR5-Überexpression und Knockdown in Abbildung 13, sowie für die unstimulierten Zellen der pLVX-Kontrolle in Abbildung 20 sollten aus strahlenbiologischer Perspektive nur mit Vorsicht interpretiert werden.

---

In der Masterarbeit Sarah Luikens von 2015, in der ebenfalls die Zelllinien Cal33 und FaDu untersucht wurden, zeigte sich in Cal33 ebenso für Zellen mit Überexpression von Delta5 wie für jene mit LGR5-Knockdown eine signifikante Radioresistenz im Vergleich zur pLVX Kontrolle. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nach Behandlung mit Cisplatin und anschließender Bestrahlung ebenfalls nachgewiesen werden.

Wie zuvor beschrieben, verhalten sich beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien unterschiedlich. Hierbei muss beachtet werden, dass es sich um zwei unterschiedliche Tumorentitäten handelt, eine Hypopharynxkarzinom-Zelllinie (FaDu) und eine Zungenkarzinom-Zelllinie (Cal33).

In unterschiedlichen Geweben herrschen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch unterschiedliche Bedingungen. Somit sind viele zelluläre Vorgänge, unerheblich ob in gesundem oder kanzerösem Gewebe, abhängig vom umgebenden Mikromilieu. Darüber hinaus sind für den Wnt-Signalweg neben Proliferationssteigerung diverse weitere Funktionen bekannt (s. 1.3.), welche sich in Abhängigkeit vom Gewebetyp und Milieu, z.B. durch Vorhandensein bzw. Abwesenheit anderer Co-Liganden und downstream Effektoren, unterschiedlich auf das zellbiologische Verhalten auswirken. In diesem Sinne kann eine aktivierte Wnt-Signalkaskade sowohl eine Proliferationssteigerung (Schlange *et al.*, 2007) als auch eine Proliferationshemmung (Kageshita *et al.*, 2001; Maelandsmo *et al.*, 2003) bewirken.

Eine definitive Aussage über die mögliche Nutzung von LGR5 bzw. des Wnt-Signalwegs als target in der Krebstherapie kann folglich nur nach individueller Untersuchung des zu therapierenden Tumors getroffen werden.

## 5.5. Überprüfung der LGR5-Modulation mittels qPCR

Zellen der Linie Cal33 und FaDu mit stabiler Überexpression von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5, sowie Knockdown aller LGR5-Varianten wurden bereits in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe mittels lentiviraler Transduktion etabliert. Zu Beginn und nach Abschluss der Versuche dieser Arbeit wurden die Effekte der Integration des LGR5 full-length- bzw. LGR5 Delta5-Konstrukts für die Überexpression, sowie der LGR5-spezifischen shRNA für den Knockdown auf die LGR5-Expression auf mRNA-Ebene mittels qPCR untersucht.

Eine Beeinflussung durch die lentivirale Transduktionsbehandlung hinsichtlich der LGR5-Modulation war in beiden Zelllinien klar zu erkennen, sie fiel jedoch unterschiedlich stark aus.

In der Zelllinie Cal33 war durch das lentivirale Konstrukt LGR5 full-length eine ca. 30 000-fache LGR5 full-length-Überexpression im Vergleich zur Leervektor-Kontrollzelllinie pLVX feststellbar. In den Cal33-Zellen mit stabil integriertem LGR5 Delta5-Konstrukt konnte eine 2600-fache

---

Überexpression von LGR5 Delta5 gezeigt werden. Der LGR5 full-length-mRNA-Gehalt schien in dieser Modulation jedoch ebenfalls angestiegen. Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass auf Grund der hohen Sequenzhomologie zwischen beiden LGR5-Varianten es nicht vermieden werden kann, dass die eingesetzten Primer zu einem geringen Teil auch jeweils die sequenzähnliche Variante erkennen. In dieser Zelllinie ist die Überexpression von LGR5 full-length (30 000-fach) um ein Vielfaches höher als die Überexpression von LGR5 Delta5 (2600-fach), sodass in der LGR5 Delta5 Kultur ein vergleichsweise hohes Level an target von den LGR5 full-length Primern gebunden und amplifiziert wird, wodurch das beobachtete Ergebnis zustande kam. Durch die shRNA 86L-Behandlung war im Vergleich zur Kontrolle keine eindeutige Herunterregulation von LGR5 mRNA festzustellen. Dies lag jedoch vor allem daran, dass der mRNA-Gehalt von LGR5 bereits in der Kontrolle am Detektionsminimum lag. Hier wäre der Einsatz sensitiverer Nachweisverfahren, wie beispielsweise der digitalen droplet PCR vorstellbar.

In der Zelllinie FaDu konnte durch das entsprechende lentivirale Konstrukt eine ca. 900-fache LGR5 full-length-Überexpression gemessen werden. Das Konstrukt für LGR5 Delta5 erzielte eine deutlich stärkere ca. 90 000-fache LGR5 Delta5-Überexpression. Auch hier zeigte sich nur eine geringfügig niedrigere LGR5-Expression durch die shRNA 86L im Vergleich zur Kontrolle, was ebenfalls an bereits sehr niedrigen Expressionswerten der Kontrollen lag.

Ein Nachweis auf Proteinebene mittels Westernblot erwies sich, wie bereits in Vorarbeiten, als schwierig. In der Zelllinie Cal33 gelang ein Nachweis von LGR5 full-length, bzw. LGR5 Delta5 auf Proteinebene, in der Zelllinie FaDu konnte dieser Nachweis trotz deutlich höherer mRNA-Level nicht erbracht werden. Die eigene Arbeitsgruppe untersuchte in den vergangenen Jahren mehrfach Modulationen von LGR5 auf Proteinebene. Auffällig war stets, dass als spezifisch bezeichnete kommerziell erhältliche Antikörper jeweils verschiedene Proteine im Westernblot detektierten.

Man muss davon ausgehen, dass die Problematik LGR-spezifischer Antikörper erst in Zukunft gelöst werden kann. Dieses technische Problem ist für den Marker LGR4 nochmals deutlich schwieriger.

Diese Ergebnisse und das nachweislich unterschiedliche Verhalten aller Modulationen in den Koloniebildungstestversuchen sprechen dafür, dass eine Hoch- bzw. Herunterregulation von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 in den untersuchten Zelllinien stattfand.

Perspektivisch wäre zum Nachweis auf Proteinebene vielleicht eine andere Methode, wie z.B. eine immunhistochemische Färbung oder ELISA besser geeignet, wären funktionelle Antikörper irgendwann verfügbar.

## 5.6. Expression tumorassoziierter Marker in Abhängigkeit von der LGR5-Expression und therapeutischen Behandlung

Als abschließende Untersuchung wurde eine Messung der Expression tumorrelevanter Gene auf mRNA-Ebene abhängig von Zelllinie, LGR5-Modulation und therapeutischer Behandlung mittels qPCR durchgeführt. Dabei stellten sich in den untersuchten Zelllinien unterschiedliche Gene als auffällig dar.

In der Zelllinie Cal33 konnten bei den Expressionsleveln der Gene CLCA2 (Chloride Channel Accessory 2) und E-Cadherin Differenzen festgestellt werden. In der Zelllinie FaDu war eine modulationsabhängige Änderung des Expressionslevels von Vimentin festzustellen.

CLCA 2 kodiert für einen durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten transmembranen Chlorid-Kanal. Dieser wird z.B. im Epithelgewebe der Lunge, Trachea und Brustdrüse exprimiert (Gruber *et al.*, 1999). Es wurde als ein Targetgen der p53-Tumorsupressorfamilie und Seneszenz-Regulator identifiziert und übt einen negativen Einfluss auf Zellmigration und Invasion aus (Sasaki *et al.*, 2012; Tanikawa *et al.*, 2012). Eine Herunterregulation hingegen verstärkt den EMT-Prozess und fördert das Auftreten von Metastasen (Walia *et al.*, 2012). Die Expression von CLCA2 stieg in jeder Modulation bei den untersuchten Zungenkarzinomzellen vor allem nach Cisplatintherapie und noch stärker nach Kombinationstherapie mit Cisplatin und Bestrahlung mit 6 Gy an. Eine Herunterregulation fand bei Zellen mit LGR5-Knockdown ohne Therapie und bei isolierter Bestrahlung bzw. isolierter Chemotherapie statt. Eine Herunterregulation bei LGR5-Knockdown wurde auch schon in der Vorarbeit gezeigt (Luiken, 2015) und spricht für einen negativen Einfluss von LGR5 auf den Stammzellcharakter und das EMT-Verhalten. Diese Reaktion geht einher mit dem Verhalten der Cal33-Zellen mit LGR5-Knockdown im Zellkoloniebildungstest. E-Cadherin gehört zur Familie der calciumabhängigen Zelladhäsionsmoleküle. Seine Herunterregulation ist ebenfalls Teil des EMT-Prozesses und fördert die Metastasierung (Cano *et al.*, 2000; Onder *et al.*, 2008). Nach Kombinationstherapie mit Cisplatin und Bestrahlung war in der Zelllinie Cal33 in allen Modulationen eine Hochregulierung zu sehen, am stärksten jedoch nach LGR5 full-length-Überexpression. Dies könnte in gewisser Weise die Ergebnisse im Koloniebildungstest und die Radiosensitivierung dieser LGR5-modifizierten Zellen erklären.

Bei der Messung der Genexpression von Vimentin auf mRNA-Ebene fiel die deutliche Steigerung nach einem LGR5-Knockdown in der Zelllinie FaDu auf. Die Hochregulation von Vimentin, einem Typ-III-Intermediärfilament des Zytoskeletts von Zellen mesenchymaler Herkunft (Steinert and Roop, 1988), spricht in oralen HNSCC-Zellen für einen aktiven EMT-Prozess (Chaw *et al.*, 2012; Ivaska, 2011). Seine Expression kann z.B. durch den  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg reguliert werden. Die Messungen sprechen somit eher gegen die im Koloniebildungstest festgestellte Sensitivierung durch LGR5-Knockdown der Zelllinie FaDu.

## 5.7. Expression Wnt-Signaling assoziierter Marker in Abhängigkeit von der LGR5-Expression

Außerdem wurden, ebenfalls mittels qPCR, die mRNA-Expressionslevel von Wnt-Signalweg-assoziierten Markern gemessen. Hierbei wurden die mit LGR5 stark verwandten Rezeptoren LGR4 und LGR6 (Barker and Clevers, 2010), ein Wnt-Ligand Wnt3a und die Wnt-Antagonisten RNF43 und ZRNF3 untersucht.

Eindeutige Ergebnisse waren für LGR4 und LGR6 nur in der Zelllinie FaDu sichtbar. Hier kam es bei LGR5-Überexpression zu einer starken Herunterregulation der LGR4- und LGR6-Rezeptoren. Dies ist erklärbar durch deren ähnliche Funktionen (Regulation des Wnt-Pathways). Hierbei könnten negative Feedback-Regulationen dazu führen, dass ein Übermaß an einem Rezeptor (LGR5) die Generierung weiterer ähnlicher Rezeptoren (LGR4/LGR6) überflüssig macht.

Wnt3a war in der Zelllinie Cal33 v.a. nach LGR5-Knockdown herunterreguliert. Dies spricht für einen internen negativen Feedback-Loop für Wnt3a bei Abwesenheit von LGR5.

In der Zelllinie FaDu hingegen konnte eine Herunterregulation des Wnt3a-Gens nach LGR5-Überexpression beobachtet werden. Somit scheint auch hier der Einfluss von LGR5 wieder zelllinienabhängig.

Dies sind jedoch nur Vermutungen für die untersuchten zwei Zelllinien. Um diese Aussagen zu bestätigen, reicht der Nachweis der Expression auf RNA-Ebene im *in vitro*-Modell nicht aus.

## 5.8. Zuverlässigkeit des *in vitro*-Modells

Insgesamt sind die Ergebnisse aller Versuche jedoch kritisch zu betrachten. Sie waren zum Teil inkonsistent und unterlagen großen Schwankungen, sowohl zwischen den untersuchten Zelllinien als auch innerhalb dieser. In den letzten Jahren wurde immer häufiger gezeigt, wie wichtig das Mikromilieu eines Tumors für sein Wachstum und sein Therapieverhalten ist. Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Zellen, des pH-Wertes, der vom Tumor selbst produzierten Faktoren etc. übt für uns noch immer unüberschaubare Einflüsse auf einen Tumor aus. All das ist im *in vitro*-Modell nur teilweise nachstellbar. Auch LGR5 unterliegt solchen Einflüssen (Morgan *et al.*, 2015), was die Beurteilung der Bedeutung seiner Expression im *in vitro*-Modell nur bedingt ermöglicht. Hinzu kommt der problematische Nachweis von LGR5 auf Proteinebene im *in vitro*-Modell. Von der untersuchten Expression auf RNA-Ebene ist keine endgültige Aussage über die tatsächlich an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren zu treffen. Perspektivisch sollte eventuell eine andere Nachweismethode in Betracht gezogen werden.

Außerdem kam es während der Hauptversuche durch einen Lieferengpass zu einem RPMI-

---

Mediumswechsel von Lonza zu Gibco, welcher die Versuchsbedingungen geringfügig verändert hat. Eine Reaktion darauf war vor allem bei FaDu zu spüren, jedoch fiel diese sehr gleichmäßig aus im Sinne von geringeren Koloniezahlen in allen Modulationen. Zusätzlich waren 6 Well Platten, ebenfalls vor allem für FaDu, nicht der am besten geeignete Kulturboden. Es kam zu häufigem Nichtanwachsen oder stark schwankenden Koloniezahlen. Eine Durchführung in Flaschen wäre mit der Anzahl der LGR5-Modulationen, Therapievarianz und eingestreuten Zellzahlen im Koloniebildungstest logistisch jedoch nicht möglich gewesen. Perspektisch, im Falle, dass die Versuche nochmalig ähnlich durchgeführt werden, sollten die Versuchsbedingungen im Vorfeld noch weiter optimiert werden.

Insgesamt können die eruierten Ergebnisse also maximal als richtungsweisend gelten, eindeutige Aussagen sind nach Abschluss dieser Arbeit und im Hinblick auf die bisher veröffentlichte Literatur zur Thematik jedoch nicht zu treffen. Eine optimierte Versuchsanordnung etwa durch Einsatz von CRISPER knock out Klonen und einer durch Immunfluoreszenz machbaren Anreicherung von Recus-Klonen von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5 wären sehr hilfreich, um eine eindeutige und abschließende Bewertung der Rolle von LGR5 Delta5 im Tumorprozess zu erhalten. Diese notwendigen neuartigen Methoden (CRISPER) wurden im Labor der MKG-Chirurgie nach dem Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit bereits erfolgreich etabliert (Rot and Kappler, 2021; Stock and Christ, 2021).

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Krebserkrankungen sind nach Erkrankungen des Herzkreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in allen Industriestaaten. Durch schlechtes Therapieansprechen, eine hohe Metastasierungsfrequenz und häufige lokale Rezidive nehmen Kopf-Hals-Tumoren einen besonderen Stellenwert ein. Bei Feststellung einer malignen Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich beträgt die Wahrscheinlichkeit, fünf Jahre nach Diagnosezeitpunkt noch am Leben zu sein, ca. 40-60%. Hierfür werden u.a. Tumorstammzellen (CSCs) verantwortlich gemacht (Li *et al.*, 2007). CSCs verbleiben häufig über geraume Zeit im Zyklusarrest und überdauern so zytotoxische Therapien wie Bestrahlung und Chemotherapie (Pawlik and Keyomarsi, 2004; Dalley *et al.*, 2015). Derzeit im Fokus der Forschung stehende Ansätze in der Krebsbehandlung sind die sogenannten targeted therapies. Tumore sollen untersucht, nach ihrem Rezeptorstatus klassifiziert und dann zielgerichtet therapiert werden. Einige solcher Therapien sind bereits zugelassen und zeigen gute Ergebnisse (z.B. Trastuzumab in der Brustkrebstherapie (Verma *et al.*, 2012)). Für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wird derzeit neben Bestrahlung und Chemotherapie bei bestimmten Indikationen eine Behandlung mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab in Kombination mit Bestrahlung empfohlen (Bonner *et al.*, 2006).

Einen weiteren potenziellen Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie stellt der Oberflächenrezeptor Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (LGR5) dar. LGR5 ist sowohl Regulator als auch Targetgen für den  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen Wnt-Signalweg und trägt damit zur Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung bei (van der Flier *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2011). Neben Wnt-Liganden als Potenziatoren ist über die LGR5-Liganden RSPO1-4 eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs möglich (Ruffner *et al.*, 2012). Ursprünglich wurde LGR5 als Stammzellmarker in basalen Kryptenzellen des Darmepithels identifiziert (Barker *et al.*, 2007). In späteren Studien stellte sich heraus, dass er bei diversen Krebserkrankungen auch als Tumorstammzellmarker dient (Wu *et al.*, 2012; Nakata *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). 2011 wurde in der eigenen Arbeitsgruppe die Spleißvariante des Rezeptors LGR5 Delta5 entdeckt (Rot *et al.*, 2011) und einige Jahre später mit einer negativen Prognose für orale Plattenepithelkarzinome assoziiert (Rot *et al.*, 2019).

Diese Arbeit diente der Untersuchung des Einflusses verschiedener Expressionslevel des LGR5-Rezeptors und seiner Spleißvariante Delta5 in zwei Kopf-Hals-Tumorzelllinien. Die Erkenntnisse sollen zum Verständnis der von LGR5 beeinflussten molekularen Funktionsweisen beitragen.

Hierzu wurde zunächst eine geeignete Konzentration der Stimulatoren Wnt3a und RSPO1 für eine mäßige Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in den zu untersuchenden Zelllinien ermittelt. Dies erfolgte mithilfe des TOPFlash-FOPFlash-Promotor-Reporter-Assays (Veeman *et al.*, 2003a). Im Anschluss wurden mittels Koloniebildungstests die Cisplatinkonzentrationen und

Bestrahlungsdosen ermittelt, bei denen sich das klonogene Überleben der beiden Zelllinien um 50 % verringerte. In den Hauptversuchen wurden, ebenfalls mittels Koloniebildungstests, das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität beider Zelllinien abhängig von veränderten LGR5-Expressionsleveln untersucht. Dafür wurden zuvor etablierte stabile LGR5-Modulationen beider Zelllinien unter Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 isoliert bestrahlt, mit Cisplatin behandelt oder einer Kombinationstherapie unterzogen. Untersucht wurden Zellen mit integriertem pLVX-Leervektor, lentiviral transduzierter Überexpression von LGR5 full-length bzw. LGR5 Delta5, sowie mittels stabilen shRNA ein Knockdown aller LGR5-Varianten und zugehöriger non target-Kontrolle. Die Überexpression bzw. der Knockdown wurden sowohl vor, als auch im Anschluss an die Hauptversuche mittels qPCR auf mRNA-Level nachgewiesen. Zum Abschluss wurde die Expression tumorrelevanter und Wnt-Signalweg-assoziiierter Gene mittels qPCR durchgeführt.

In der Zelllinie Cal33 zeigte sich nach Behandlung mit Cisplatin bei Zellen mit LGR5 Delta5-Überexpression sowie LGR5-Knockdown eine signifikante Resistenzerhöhung gegenüber Radiotherapie. In der Zelllinie FaDu konnte ein gegensätzliches Verhalten beobachtet werden. Bei Knockdown aller LGR5-Varianten kam es sowohl bei alleiniger Bestrahlung als auch bei Kombinationstherapie mit Cisplatin zu einer Radiosensitivierung der Zellen. In allen anderen Modulationen waren in der FaDu-Zelllinie keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Die Untersuchung der Expression tumorrelevanter Gene lieferte in der Zelllinie Cal33 ebenfalls im Wesentlichen therapieabhängige Ergebnisse. In der Zelllinie FaDu konnte allerdings eine generelle Hochregulation von Vimentin nach LGR5-Knockdown gezeigt werden.

Eine definitive Aussage über die Bedeutung von LGR5 in Kopf-Hals-Tumoren ist nach Abschluss dieser Arbeit nicht zu treffen. Die Ergebnisse deuten jedoch, auch in Bezug auf den aktuellen Forschungsstand, auf eine tumorabhängige Funktion hin, zumal unterstreichen die Resultate die hohe Heterogenität der Kopf-Hals-Tumoren. Ebenso sprechen die Versuchsergebnisse der Zelllinie Cal33 für eine mögliche größere Bedeutung der Spleißvariante LGR5 Delta5 als der full-length-Variante in manchen Tumoren. In jedem Fall konnte durch die Veränderung der LGR5-Expression jedoch in beiden Zelllinien eine Änderung des strahlenbiologischen Verhaltens und teilweise auch der Chemosensitivität festgestellt werden. Dies gibt Anlass zur fortführenden Forschung auf diesem Gebiet. Um eine dem *in vivo*-Modell näher kommende Untersuchung durchzuführen, könnte ein Sphäroidmodell genutzt werden, in dem Zellen ein dreidimensionales Wachstumsverhalten zeigen. Langfristig sollten zur Untersuchung möglichst realistischer Verhältnisse auch Versuche im Mausmodell durchgeführt werden. Erst wenn so der definitive Einfluss von LGR5 auf Tumorprogression, Malignität und Therapieverhalten bewiesen ist, sollte das Rezeptorprotein LGR5 als therapeutisches Target genutzt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Anastas, J.N. and Moon, R.T. (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **13**, 11–26.
- Barker, N. *et al.* (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, **449**, 1003–1007.
- Barker, N. *et al.* (2012) Lgr5(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development. *Cell reports*, **2**, 540–552.
- Barker, N. *et al.* (2013) Lgr proteins in epithelial stem cell biology. *Development (Cambridge, England)*, **140**, 2484–2494.
- Barker, N. and Clevers, H. (2010) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology*, **138**, 1681–1696.
- Becker, L. *et al.* (2008) Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *TheScientificWorldJournal*, **8**, 1168–1176.
- Bertram, J.S. (2000) The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, **21**, 167–223.
- Bienz, M. and Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, **103**, 311–320.
- Boddupally, K. *et al.* (2016) Lgr5 Marks Neural Crest Derived Multipotent Oral Stromal Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **34**, 720–731.
- Bonner, J.A. *et al.* (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*, **354**, 567–578.
- Bonnet, D. and 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.
- Bourhis, J. *et al.* (2004) Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head & Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy. *JCO*, **22**, 5505.
- Brack, A.S. *et al.* (2007) Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science (New York, N.Y.)*, **317**, 807–810.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- Burtneß, B. *et al.* (2019) Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*, **394**, 1915–1928.
- Cano, A. *et al.* (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*, **2**, 76–83.
- Carmon, K.S. *et al.* (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.
- Chaw, S.Y. *et al.* (2012) Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral oncology*, **48**, 997–1006.
- Chen, M. *et al.* (2014) Wnt-responsive Lgr5<sup>+</sup> globose basal cells function as multipotent olfactory epithelium progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 8268–8276.
- Chen, P.-H. *et al.* (2013) The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes & Development*, **27**, 1345–1350.
- Chen, Q. *et al.* (2014) LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncotarget*, **5**, 9092–9105.

- Clarke, M. F. and Hass, A. T. (2006) Cancer Stem Cells, American Cancer Society.
- Clarke, M.F. *et al.* (2006) Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, **66**, 9339–9344.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127**, 469–480.
- Clevers, H. *et al.* (2014) Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science (New York, N.Y.)*, **346**, 1248012.
- Clevers, H. and Nusse, R. (2012) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*, **149**, 1192–1205.
- Dalley, A.J. *et al.* (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.
- Dick, J.E. (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, **112**, 4793–4807.
- Dickinson, M.E. and McMahon, A.P. (1992) The role of Wnt genes in vertebrate development. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2**, 562–566.
- Fan, X.-S. *et al.* (2010) Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *International Journal of Colorectal Disease*, **25**, 583–590.
- Fearon, E.R. and Spence, J.R. (2012) Cancer biology: a new RING to Wnt signaling. *Current biology : CB*, **22**, R849–51.
- Frederick S. Philips *et al.* (1967) Hydroxyurea. *Cancer Res*, **27**, 61–75.
- Fredriksson, R. *et al.* (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.
- Garcia, M.I. *et al.* (2009) LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Developmental biology*, **331**, 58–67.
- Gatenby, R.A. *et al.* (1988) Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, **14**, 831–838.
- GeneCards Human Gene LGR5 Gene - GeneCards | LGR5 Protein | LGR5 Antibody.  
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LGR5&keywords=lgr5> (last accessed March 25, 2019).
- Gioanni, J. *et al.* (1988) Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: Establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **24**, 1445–1455.
- Glinka, A. *et al.* (2011) LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports*, **12**, 1055–1061.
- Graeber, T.G. *et al.* (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88–91.
- Gruber, A.D. *et al.* (1999) Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *The American journal of physiology*, **276**, C1261–70.
- Hammarstedt, L. *et al.* (2006) Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *International journal of cancer*, **119**, 2620–2623.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.
- Hao, H.-X. *et al.* (2012) ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, **485**, 195–200.
- He, X. *et al.* (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 1663–1677.
- Hicks, W.L. *et al.* (1997) Squamous cell carcinoma of the floor of mouth: a 20-year review. *Head & neck*, **19**, 400–405.
- Hsu, H.-C. *et al.* (2013) Overexpression of Lgr5 correlates with resistance to 5-FU-based

- chemotherapy in colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, **28**, 1535–1546.
- Huch, M. *et al.* (2013a) In vitro expansion of single Lgr5<sup>+</sup> liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, **494**, 247–250.
- Huch, M. *et al.* (2013b) Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *The EMBO journal*, **32**, 2708–2721.
- Ivaska, J. (2011) Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases*, **2**, 51–53.
- Jaks, V. *et al.* (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics*, **40**, 1291–1299.
- Jonge, H.J.M. de *et al.* (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. *PloS one*, **2**, e898.
- Kageshita, T. *et al.* (2001) Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *The British journal of dermatology*, **145**, 210–216.
- Kalluri, R. and Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, **112**, 1776–1784.
- Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, **119**, 1420–1428.
- Kaur, N. *et al.* (2013) Wnt3a mediated activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Molecular and cellular neurosciences*, **54**, 44–57.
- Kishida, S. *et al.* (1999) DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Molecular and cellular biology*, **19**, 4414–4422.
- Koo, B.-K. *et al.* (2012) Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, **488**, 665–669.
- Koo, B.-K. and Clevers, H. (2014) Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology*, **147**, 289–302.
- Kovács, A.F. (2004) Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, **33**, 447–453.
- Kreso, A. and 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.
- Kusserow, A. *et al.* (2005) Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, **433**, 156–160.
- Lappano, R. and Maggiolini, M. (2012) GPCRs and cancer. *Acta pharmacologica Sinica*, **33**, 351–362.
- Latek, D. *et al.* (2012) G protein-coupled receptors — recent advances. *Acta biochimica Polonica*, **59**, 515–529.
- Lau, W. de *et al.* (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, **476**, 293–297.
- Lau, W. de *et al.* (2014) The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & Development*, **28**, 305–316.
- Li, F. *et al.* (2007) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*, **17**, 3–14.
- Li, F. *et al.* (2020) Lgr5 maintains stemness and regulates cell property in nasopharyngeal carcinoma through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Stem Cell Research*, **47**, 101916.
- Li, V.S.W. *et al.* (2012) Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, **149**, 1245–1256.
- Lin, Y.U. *et al.* (2015) LGR5 promotes the proliferation of colorectal cancer cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncology letters*, **9**, 2859–2863.
- Liu, D. *et al.* (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.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**, 402–408.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, **20**, 781–810.
- Löning, T. *et al.* (1985) Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *The Journal of investigative dermatology*, **84**, 417–420.
- Luiken, S. (2015) Analyse des LGR5-assoziierten Pathways in verschiedenen Kopf-Hals-Tumorzelllinien. Abschlussarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science, Klinik für Mund-, Kiefer und plastische Gesichtschirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- MacDonald, B.T. *et al.* (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, **17**, 9–26.
- Maelandsmo, G.M. *et al.* (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.
- Maier, H. *et al.* (1992) Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *The Clinical investigator*, **70**, 320–327.
- Maier, H. *et al.* (1993) Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, **108**, 655–661.
- Malinauskas, T. and Jones, E.Y. (2014) Extracellular modulators of Wnt signalling. *Current opinion in structural biology*, **29**, 77–84.
- Mathers, C.D. and Loncar, D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, **3**, e442.
- McClanahan, T. *et al.* (2006) Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer biology & therapy*, **5**, 419–426.
- McDonald, T. *et al.* (1998) Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 266–270.
- McMahon, A.P. and Moon, R.T. (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*, **58**, 1075–1084.
- Mehanna, H. *et al.* (2010) Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ (Clinical research ed.)*, **341**, c4684.
- Moon, R.T. *et al.* (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews. Genetics*, **5**, 691–701.
- Morgan, R.G. *et al.* (2015) Nutrient stress alters the glycosylation status of LGR5 resulting in reduced protein stability and membrane localisation in colorectal tumour cells: implications for targeting cancer stem cells. *Br J Cancer*, **112**, 714–719.
- Morita, H. *et al.* (2004) Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Molecular and cellular biology*, **24**, 9736–9743.
- Nakata, S. *et al.* (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.
- NCBI LGR5 leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=8549>

- #gene-expression (last accessed April 23, 2019).
- Ng, A. *et al.* (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. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23–28.
- Nusse, R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell research*, **15**, 28–32.
- Nusse, R. (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cell research*, **18**, 523–527.
- Nusse, R. and Varmus, H.E. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, **31**, 99–109.
- Nusse, R. and Varmus, H.E. (1992) Wnt genes. *Cell*, **69**, 1073–1087.
- Onder, T.T. *et al.* (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*, **68**, 3645–3654.
- Osawa, H. *et al.* (2016) Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer. *British journal of cancer*, **114**, 1251–1260.
- Pawlik, T.M. and Keyomarsi, K. (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, **59**, 928–942.
- Peng, W.C. *et al.* (2013) Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell reports*, **3**, 1885–1892.
- Pignon, J.P. *et al.* (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *The Lancet*, **355**, 949–955.
- Pinson, K.I. *et al.* (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**, 535–538.
- Plaks, V. *et al.* (2013) Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell reports*, **3**, 70–78.
- Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*, **14**, 1837–1851.
- Polakis, P. (2012) Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4**, 2012: 10.1101/cshperspect.a008052.
- Pulte, D. and Brenner, H. (2010) Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *The Oncologist*, **15**, 994–1001.
- Queimado, L. *et al.* (2008) Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, **134**, 94–101.
- Rangan, S.R.S. (1972) A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, **29**, 117–121.
- Rassow, J., Hauser Karin, Netzker Roland and Deutzmann, R. (2012) Biochemie: 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen, 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843–850.
- Rijsewijk, F. *et al.* (1987) The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, **50**, 649–657.
- RKI 2017 Krebs in Deutschland | 2013/2014.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?jsessionid=770AF5F7B8F53059A98EB17839C9F554.internet082?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?jsessionid=770AF5F7B8F53059A98EB17839C9F554.internet082?__blob=publicationFile) (last accessed March 05, 2019).
- RKI 2019 Krebs in Deutschland | 2015/2016.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile) (last accessed October 05, 2021).
- Rot, S. *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. *BMC Cancer*, **11**, 2247.
- Rot, S. (2017) Molekulare Charakterisierung des Stammzellmarkers LGR5 und der

- Spleißvariante LGR5 $\Delta$ 5 in humanen Tumoren.
- Rot, S. *et al.* (2019) Prognostic impact of mRNA levels of LGR5 transcript variants in OSCC patients. *BMC Cancer*, **19**, 155.
- Rot, S. and Kappler, M. (2021) Modulation of a Stem Cell Gene: LGR4 Knockout in a Human Cell Line by CRISPR/Cas Method. In, *In Vitro Models for Stem Cell Therapy*. Humana, New York, NY, 255–268.
- Ruffner, H. *et al.* (2012) R-Spondin potentiates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. *PLoS one*, **7**, e40976.
- S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Langversion S3 Mundhöhlenkarzinom
- Sabitha *et al.* (2018) Significant Role of LGR-5 in Oral Cancer and Oral Dysplasia- A Review. Review article. *JAMDSR*, 2018.
- Samarzija, I. *et al.* (2009) Wnt3a regulates proliferation and migration of HUVEC via canonical and non-canonical Wnt signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, **386**, 449–454.
- Sasaki, Y. *et al.* (2012) CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. *Cancer biology & therapy*, **13**, 1512–1521.
- Sato, T. *et al.* (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, **459**, 262–265.
- Schlange, T. *et al.* (2007) Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast cancer research : BCR*, **9**, R63.
- Shi, F. *et al.* (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.
- Sinclair, W.K. (1968) Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells in Vitro. *Radiation Research*, **33**, 620.
- Song, J. *et al.* (2010) Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS one*, **5**, e11456.
- Sriram, K. and Insel, P.A. (2018) G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology*, **93**, 251–258.
- Steinert, P.M. and Roop, D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual review of biochemistry*, **57**, 593–625.
- Stock, P. and Christ, B., eds. (2021) *In Vitro Models for Stem Cell Therapy*. New York, NY, Springer US.
- Stoick-Cooper, C.L. *et al.* (2007) Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development (Cambridge, England)*, **134**, 479–489.
- Tamai, K. *et al.* (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, **407**, 530–535.
- Tanikawa, C. *et al.* (2012) CLCA2 as a p53-Inducible Senescence Mediator<sup>12</sup>. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **14**, 141–149.
- Trzaskowski, B. *et al.* (2012) Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *CMC*, **19**, 1090–1109.
- Uzcudun, A.E. *et al.* (2002) Nutrition and pharyngeal cancer: results from a case-control study in Spain. *Head & neck*, **24**, 830–840.
- van der Flier, L.G. *et al.* (2007) The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, **132**, 628–632.
- van Hiel, M.B. *et al.* (2012) An evolutionary comparison of leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptors reveals a novel LGR subtype. *Peptides*, **34**, 193–200.
- Veeman, M.T. *et al.* (2003a) A Second Canon. *Developmental Cell*, **5**, 367–377.
- Veeman, M.T. *et al.* (2003b) Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Current biology : CB*, **13**, 680–685.

- Verma, S. *et al.* (2012) Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*, **367**, 1783–1791.
- Vider, B.Z. *et al.* (1996) Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene*, **12**, 153–158.
- Visser, K.E. de *et al.* (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.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG*, **9**, 138–141.
- Vokes, E.E. *et al.* (1997) Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*, **350**, 1087–1091.
- Walia, V. *et al.* (2012) Loss of breast epithelial marker hCLCA2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and indicates higher risk of metastasis. *Oncogene*, **31**, 2237–2246.
- Wang, B. *et al.* (2016) LGR5 Is a Gastric Cancer Stem Cell Marker Associated with Stemness and the EMT Signature Genes NANOG, NANOGP8, PRRX1, TWIST1, and BMI1. *PLOS ONE*, **11**, e0168904.
- Wang, D. *et al.* (2013) Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes & Development*, **27**, 1339–1344.
- Wang, Z. and 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.
- Wnt Target genes | The Wnt Homepage (2022.000Z).  
[https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target\\_genes](https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes) (last accessed July 06, 2022.523Z).
- Wu, X.-S. *et al.* (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. *et al.* (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. *et al.* (2013) Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathology international*, **63**, 13–19.
- Yee, K.K. *et al.* (2013) Lgr5-EGFP marks taste bud stem/progenitor cells in posterior tongue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **31**, 992–1000.
- ZfKD 2021 (2021) Krebs - Krebs in Mundhöhle und Rachen.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mundhoehle\\_Rachenkrebs/mundhoehle\\_rachen\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mundhoehle_Rachenkrebs/mundhoehle_rachen_node.html) (last accessed October 06, 2021).

## 8. Thesen

- (1) Eine Stimulierung mit Wnt3a- und RSPO1 führt in den Zelllinien Cal33 und FaDu zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg-Aktivität.
- (2) Eine veränderte Expression des Oberflächenrezeptors LGR5 full-length und seiner Spleißvariante LGR5 Delta5 scheint einen Einfluss auf das strahlenbiologische Verhalten und die Chemosensitivität der Zelllinien Cal33 und FaDu zu haben.
- (3) Die Überexpression von LGR5 Delta5 führt nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in der Zelllinie Cal33 zu einem erhöhten klonogenen Überleben.
- (4) Die Überexpression von LGR5 Delta5 und der Knockdown aller LGR5-Varianten führen nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in der Zelllinie Cal33 zu einer erhöhten Strahlenresistenz bei vorheriger Cisplatinbehandlung.
- (5) Der Knockdown aller LGR5-Varianten führt nach Stimulation mit Wnt3a und RSPO1 in der Zelllinie FaDu zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin.
- (6) Der Knockdown aller LGR5-Varianten führt in der Zelllinie FaDu zu einer Hochregulation von Vimentin auf mRNA-Ebene.

## 9. Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kanonischer $\beta$ -Catenin-abhanger Wnt-Signalweg (Clevers, 2006)	6
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors und seinen 7- Transmembran-Domänen Bild (Trzaskowski <i>et al.</i> , 2012)	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors 1-8 (Latek <i>et al.</i> , 2012)	9
Abbildung 4: R-Spondin- und LGR5-abhängige Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalweges Abbildung (Koo and Clevers, 2014)	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vektoren im TOPFlash/FOPFlash Reporter Assay Abbildung angelehnt an (Rot, 2017)	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung zum Ablauf des Koloniebildungstests	26
Abbildung 7: Aktivität des TOPFlash Reporters in FaDu und Cal33	34
Abbildung 8: A und B. ExpDec1-Fit der klonogenen Überlebensrate nach Behandlung mit Cisplatin der Zelllinie Cal33 pLVX (A) und der Zelllinie FaDu pLVX (B)	35
Abbildung 9 (A,B): Klonogenes überleben in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in den Zelllinie Cal33 (A) und FaDu (B)	37
Abbildung 10: Klonogenes überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5- Expression in der Zelllinie Cal33	39
Abbildung 11: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33	40
Abbildung 12: Klonogenes überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5- Expression in der Zelllinie FaDu	41
Abbildung 13: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu	43
Abbildung 14: Klonogenes überleben nach Behandlung mit Cisplatin in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33	44
Abbildung 15: Klonogenes überleben nach Behandlung mit Cisplatin in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu	45
Abbildung 16: Klonogenes überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33	46
Abbildung 17: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Cisplatinbehandlung und Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33	48
Abbildung 18: Klonogenes überleben nach Cisplatinbehandlung und Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie Cal33	49
Abbildung 19: Klonogenes überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu	50
Abbildung 20: Linearquadratischer Fit des klonogenen Überlebens nach Behandlung mit Cisplatin und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu	51
Abbildung 21: Klonogenes überleben nach Behandlung mit Cisplatin und Bestrahlung mit 3, bzw. 6Gy in Abhängigkeit von der LGR5-Expression in der Zelllinie FaDu	53
Abbildung 22: Relativer mRNA-Gehalt von LGR5 full-length (links) bzw. LGR5 Delta5 (rechts) in der Zelllinie Cal33	53
Abbildung 23: LGR5-Expression auf Proteinebene in den verschiedenen LGR5-Modulationen in der Zelllinie Cal33	54
Abbildung 24: Relativer mRNA-Gehalt von LGR5 full-length (links) bzw. LGR5 Delta5 (rechts) in der Zelllinie FaDu	55
Abbildung 25: Relativer mRNA-Gehalt an Vimentin in der Zelllinie FaDu abhängig von	

---

Modulation der LGR5-Expression ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.	56
Abbildung 26: Relativer mRNA-Gehalt an CLCA2 in der Zelllinie Cal33 abhängig von der Modulation der LGR5-Expression ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.	57
Abbildung 27: Relativer mRNA-Gehalt an E-Cadherin in der Zelllinie Cal33 abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Therapie und nach Cisplatintherapie und/oder Bestrahlung.	57
Abbildung 28, 29: Relativer mRNA-Gehalt von LGR4 und LGR6 in der Zelllinie FaDu abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Chemo- oder Radiotherapie.	58
Abbildung 30, 31: Relativer mRNA-Gehalt von Wnt3a in der Zelllinie Cal33 sowie FaDu abhängig von der Behandlung mit verschiedenen lentiviralen Konstrukten ohne Chemo- oder Radiotherapie.	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewebe mit nachgewiesenen LGR5-positiven Stammzellen, Auszug	10
Tabelle 2: Tumorzelllinien	16
Tabelle 3: LGR5-Modulationen	16
Tabelle 4: Taqman-Sonden	18
Tabelle 5: Biozymsonden für LGR5 full-length und LGR5 Delta5	18
Tabelle 6: Primäre Antikörper	19
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper	19
Tabelle 8: Transfektionsmix TOPFlash/FOPFlash-Assay	23
Tabelle 9: Stimulationskonzentrationen Wnt3a und RSPO1	23
Tabelle 10: Cisplatin-Konzentrationen zur IC50-Bestimmung	25
Tabelle 11: Versuchsaufbau	26
Tabelle 12: Pipettierschema qPCR LGR5 full-length, LGR5 Delta5	29
Tabelle 13: Zyklusschema qPCR LGR5 full-length, LGR5 Delta5	30
Tabelle 14: Pipettierschema qPCR Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3	30
Tabelle 15: Zyklusschema qPCR Vimentin, CLCA2, E-Cadherin, MDM2, ABCB1, LGR6, LGR4, Wnt3a, RNF43 und ZRNF3	30
Tabelle 16: Zusammensetzung Trenngel	31
Tabelle 17: Zusammensetzung Sammelgel	32
Tabelle 18: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF10 [Gy] und DMF10 der Zelllinie Cal33	43
Tabelle 19: Verstärkungsfaktor bei 3 und 6Gy in der Zelllinie Cal33	43
Tabelle 20: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF10 [Gy] und DMF10 der Zelllinie FaDu	44
Tabelle 21: Verstärkungsfaktor bei 3 und 6Gy in der Zelllinie FaDu	44
Tabelle 22: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF10 [Gy] bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Modulation in der Zelllinie Cal33	48
Tabelle 23: Verstärkungsfaktor bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung mit 3, bzw. 6 Gy abhängig von der LGR5-Modulation in der Zelllinie Cal33	48
Tabelle 24: Bestrahlungsdosis zur Erlangung SF10 [Gy] bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung in Abhängigkeit von der LGR5-Modulation in der Zelllinie FaDu	52
Tabelle 25: Verstärkungsfaktor bei Cisplatinbehandlung und anschließender Bestrahlung mit 3, bzw. 6 Gy abhängig von der LGR5-Modulation in der Zelllinie FaDu	52

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift