

Diskussionen, Statistiken und Autorenprofile zu dieser Veröffentlichung finden Sie unter: <https://www.researchgate.net/publication/230618872>

Behandlungsbedingte Schädigung der Mikroumgebung des Tumors fördert die Therapieresistenz bei Prostatakrebs durch WNT16B

Artikel in Nature Medicine - August 2012 DOI: 10.1038/nm.2890 - Quelle: PubMed

ZITATE

716

READS

690

8 authors, including:



Yu Sun

Stony Brook University

40 VERÖFFENTLICHUNGEN 2,221 ZITATE

SEE PROFILE



Celestia S Higano

University of Washington Seattle 543

VERÖFFENTLICHUNGEN 45,733 ZITATE

SEE PROFILE



Tomasz Beer

Oregon Health and Science University 486

VERÖFFENTLICHUNGEN 31,045 ZITATE

SEE PROFILE



Ilsa Mae Coleman

Fred Hutch Cancer Center

254 VERÖFFENTLICHUNGEN 13,910 ZITATE

SEE PROFILE

Behandlungsbedingte Schädigung des Tumormilieus fördert die Therapieresistenz von Prostatakrebs durch WNT16B

Yu Sun¹, Judith Campisi^{2,3}, Celestia Higano^{4,5}, Tomasz M Beer^{6,7}, Peggy Porter¹, Ilsa Coleman¹, Lawrence True⁸ & Peter S Nelson^{1,4,5,8}

Die erworbene Resistenz gegen Krebstherapien ist ein wesentliches Hindernis für die Verringerung der Morbidität und Mortalität, die auf bösartige Tumoren zurückzuführen sind. Es ist bekannt, dass Komponenten der Mikroumgebung von Geweben den zellulären Phänotyp, einschließlich der Anfälligkeit für toxische Einflüsse, stark beeinflussen. Anhand einer genomweiten Analyse der Transkriptionsreaktionen auf genotoxischen Stress, der durch Krebstherapeutika ausgelöst wird, haben wir ein Spektrum von sekretierten Proteinen aus der Tumormikroumgebung identifiziert, zu denen auch das Wnt-Familienmitglied 16B (WNT16B) gehört, das zur MMTV-Integrationsstelle vom Wingless-Typ gehört. Wir haben festgestellt, dass die Expression von WNT16B durch den Nuclear Factor of κ Light Polypeptide Gene Enhancer in B Cells 1 (NF- κ B) nach DNA-Schäden reguliert wird und anschließend auf parakrine Weise Signale zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Programms in Tumorzellen sendet. Die Expression von WNT16B in der Mikroumgebung des Prostata Tumors schwächte die Wirkung einer zytotoxischen Chemotherapie *in vivo* ab und förderte das Überleben der Tumorzellen und das Fortschreiten der Krankheit. Diese Ergebnisse beschreiben einen Mechanismus, durch den genotoxische Therapien, die zyklisch verabreicht werden, die anschließende Behandlungsresistenz durch nicht-autonome Zellwirkungen, die von der Mikroumgebung des Tumors beigetragen werden, verstärken können.

Ein Haupthindernis für eine wirksamere Krebsbehandlung ist die Fähigkeit von Tumoren, eine Resistenz gegen zytotoxische und zytostatische Therapeutika zu entwickeln, eine Entwicklung, die bei Patienten mit metastasierenden Karzinomen zu Behandlungsfehlern von über 90 % beiträgt¹. Bemühungen zur Umgehung der zellulären Überlebensmechanismen nach einer Chemotherapie haben Systeme definiert, die den Import, Export oder Metabolismus von Medikamenten durch Tumorzellen modulieren²⁻⁶. Verbesserte Schadensbehebung und Modifikationen der Apoptose- und Seneszenzprogramme tragen ebenfalls zur *de novo* oder erworbenen Toleranz gegenüber antineoplastischen Behandlungen bei^{3,7,8}. Die Erkenntnis, dass Ex-vivo-Tests zur Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie keine genaue Vorhersage des Ansprechens *in vivo* erlauben, deutet außerdem darauf hin, dass auch die Mikroumgebung des Tumors wesentlich zur Lebensfähigkeit der Zellen nach toxischen Einwirkungen beiträgt⁹⁻¹¹. So kann beispielsweise die Zelladhäsion an Matrixmoleküle die Entscheidung über Leben und Tod in Tumorzellen beeinflussen, die auf eine Schädigung reagieren¹²⁻¹⁴. Darüber hinaus führt die räumliche Organisation von Tumoren im Verhältnis zum Gefäßsystem zu Gradienten der Medikamentenkonzentration, der Sauerstoffversorgung, des Säuregehalts und des Zustands der Zellproliferation, die alle das Überleben der Zellen und die anschließende Kinetik der Tumorrepopulation erheblich beeinflussen können^{15,16}.

Die meisten zytotoxischen Wirkstoffe zielen selektiv auf Krebserkrankungen ab, indem sie unterschiedliche Merkmale von Tumorzellen wie hohe Proliferationsraten, Hypoxie und Genominstabilität ausnutzen, was zu einem günstigen therapeutischen Index führt. Krebstherapien greifen jedoch auch gutartige Zellen an und können die normale Funktion und Physiologie von Geweben und Organen stören. Um eine Letalität des Wirts zu vermeiden, stützen sich die meisten Krebstherapien nicht auf einzelne, überwältigende Behandlungsdosen: Sowohl die Strahlen- als auch die Chemotherapie werden in Abständen

verabreicht, um die Erholung lebenswichtiger normaler Zelltypen zu ermöglichen. Die Pausen zwischen den Behandlungszyklen ermöglichen es den Tumorzellen jedoch auch, sich zu erholen, Überlebensmechanismen zu aktivieren und auszunutzen und sich gegen nachfolgende therapeutische Eingriffe zu wehren.

Hier haben wir die Hypothese getestet, dass behandlungsassoziierte DNA-Schadensreaktionen in gutartigen Zellen, die die Mikroumgebung des Tumors bilden, die Therapieresistenz und das anschließende Fortschreiten des Tumors fördern. Wir liefern *in vivo* Beweise für behandlungsbedingte Veränderungen im Tumorstroma, die die Expression eines vielfältigen Spektrums von sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren einschließen. Unter anderem zeigen wir, dass WNT16B in Fibroblasten durch NF- κ B aktiviert wird und im neoplastischen Prostataepithel durch parakrine Signalübertragung einen epithelialen zu mesenchymalen Übergang (EMT) fördert. Darüber hinaus fördert WNT16B, das nicht zellautonom wirkt, das Überleben von Krebszellen nach einer zytotoxischen Therapie. Wir kommen zu dem Schluss, dass Ansätze, die auf Bestandteile der Mikroumgebung des Tumors abzielen, in Verbindung mit konventionellen Krebstherapeutika die Behandlungsergebnisse verbessern können.

ERGEBNISSE

Therapie induziert Schadensreaktionen in der Mikroumgebung des Tumors

Um festzustellen, ob die Behandlung in gutartigen Zellen, die die Mikroumgebung des Tumors bilden, eine Schadensreaktion hervorruft, untersuchten wir Gewebe, das vor und nach der Chemotherapie bei Männern mit Prostatakrebs entnommen wurde, die an einer neoadjuvanten klinischen Studie teilgenommen hatten, bei der das genotoxische Medikament Mitoxantron (MIT) und das Mikrotubuli-Gift Docetaxel (DOC) kombiniert wurden (Abb. 1a)^{17,18}.

¹Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA. ²Buck Institute for Research on Aging, Novato, California, USA.

³Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA. ⁴Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA. ⁵Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ⁶Division of Hematology and Medical Oncology, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA. ⁷Knight Cancer Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA. ⁸Department of Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. Correspondence should be addressed to P.S.N. (pnelson@fhcrc.org).

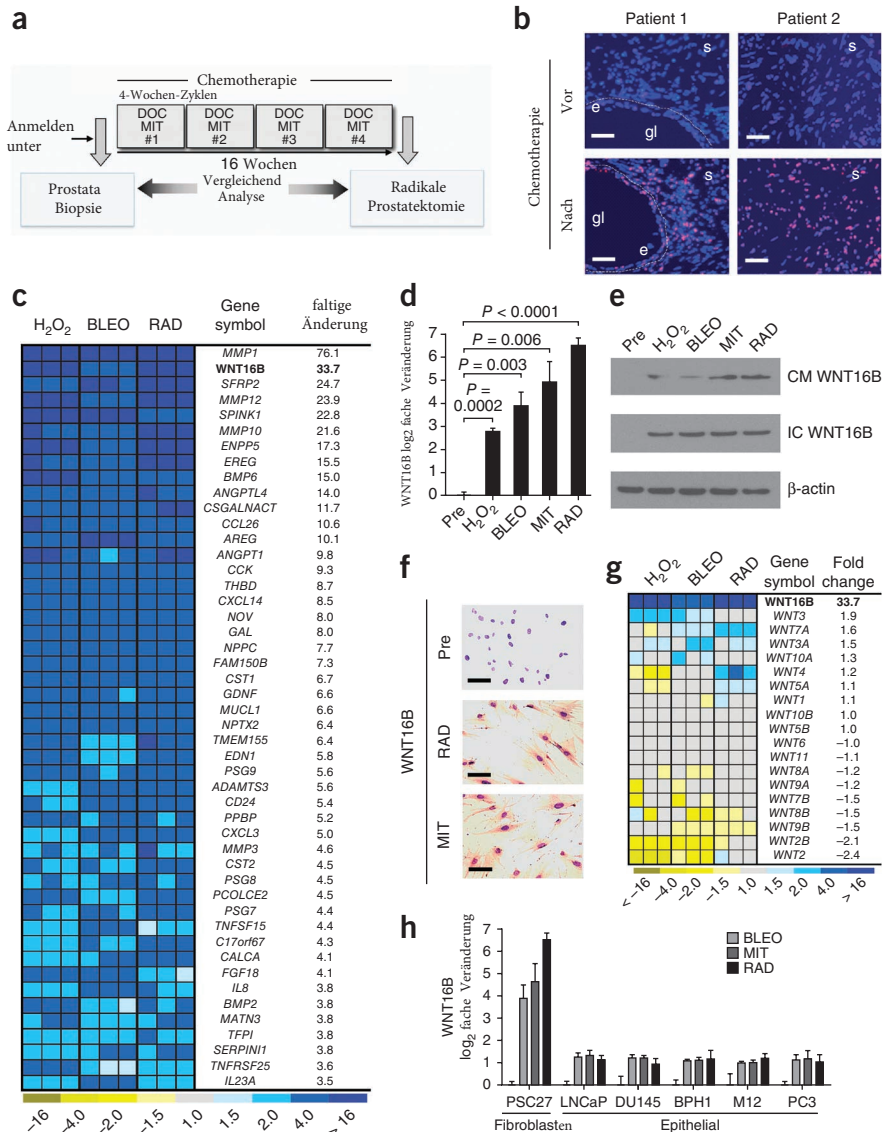
Received 25 April 2011; accepted 8 June 2012; published online 5 August 2012; doi:10.1038/nm.2890

Nach der Chemotherapie fanden wir in Fibroblasten und glatten Muskelzellen, die das Prostatastroma bilden, Hinweise auf DNA-Schäden, die durch die Phosphorylierung von Histon H2AX auf Ser139 (γ -H2AX) bestimmt wurden (Abb. 1b). Um die molekularen Folgen von DNA-Schäden in gutartigen Zellen zu ermitteln, behandelten wir primäre Prostata-Fibroblasten (PSC27-Zellen) mit MIT, Bleomycin (BLEO), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Gammastrahlung (RAD), die jeweils die Zahl der γ -H2AX-Foci erheblich erhöhten (ergänzende Abb. 1a,b). Wir verwendeten Ganzgenom-Microarrays zur Quantifizierung von Transkripten in PSC27-Zellen und stellten fest, dass die Spiegel von 727 bzw. 329 mRNAs infolge dieser genotoxischen Expositionen häufig erhöht bzw. verringert waren (Falschdeckungsrate von 0,1 %) (ergänzende Abb. 1c). Um unsere Studien auf die Faktoren zu konzentrieren, die eindeutig das Potenzial für parakrine Effekte auf Tumorzellen haben, untersuchten wir Gene mit einer mindestens 3,5-fach erhöhten Expression nach genotoxischen Behandlungen, die für extrazelluläre Proteine kodieren, die hier zusammenfassend als DNA-Schadenssekretionsprogramm (DDSP) bezeichnet werden (Abb. 1c). In Übereinstimmung mit früheren Studien waren die Transkripte, die für Matrix-Metalloproteinasen wie MMP1, Chemokine wie CXCL3 und Peptid-Wachstumsfaktoren wie Ampiregulin kodieren, in PSC27-Fibroblasten nach genotoxischen Schäden deutlich erhöht^{19,20}. Insbesondere die Expression von WNT16B stieg infolge dieser Behandlungen um das Achtfache bis 64-fache ($P < 0,005$) (Abb. 1c,d).

Abbildung 1 Genotoxische Schäden an primären Prostata-Fibroblasten induzieren die Expression eines Spektrums von sekretierten Proteinen, zu denen auch WNT16B gehört. (a) Schematische Darstellung des Behandlungsschemas für Prostatakrebs, bestehend aus einer Prostatabiopsie vor der Behandlung und vier Zyklen neoadjuvanter DOC- und MIT-Chemotherapie, gefolgt von einer radikalen Prostataektomie. (b) DNA-Schadensherde in menschlichem Prostatagewebe, das vor und nach der Chemotherapie entnommen wurde. Die Gewebeschnitte wurden mit Antikörpern zur Erkennung von γ -H2AX (rote und rosafarbene Signale) untersucht, und die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Gl, Drüsenlumen; e, Epithel; s, Stroma. Maßstabsbalken, 50 μ m. (c) Analyse der Veränderungen der Genexpression in Prostata-Fibroblasten durch Quantifizierung mittels Transkript-Mikroarray. Die Heatmap zeigt die relativen mRNA-Konzentrationen nach Exposition mit H_2O_2 , BLEO oder RAD im Vergleich zu mit Vehikel behandelten Zellen. Die Säulen sind Wiederholungsexperimente. WNT16B ist zur Verdeutlichung fett hervorgehoben. (d) Messungen der WNT16B-Expression durch qRT-PCR in Prostata-Fibroblasten. Dargestellt sind die \log_2 -Transkriptmessungen vor (Pre) oder nach der Exposition gegenüber den angegebenen Faktoren im Vergleich zu im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollzellen. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. von Triplikaten. Der P-Wert wurde durch Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem t-Test, berechnet. (e) WNT16B-Proteinexpression in extrazellulärem konditioniertem Medium (CM) von Prostata-PSC27-Fibroblasten oder in Zelllysaten (IC) nach genotoxischen Expositionen. β -Actin ist eine Ladekontrolle. (f) Immunhistochemische Analyse der WNT16B-Expression in Prostata-Fibroblasten vor (Pre) und nach Exposition mit MIT oder RAD. Braunes Chromogen zeigt die WNT16B-Expression an. Maßstabsbalken, 50 μ m. (g) Expression von Mitgliedern der Wnt-Familie in Prostata-Fibroblasten nach Exposition mit DNA-schädigenden Substanzen. Die Quantifizierung der Transkripte wurde durch Microarray-Hybridisierung bestimmt. Die Spalten stellen unabhängige Replikationsexperimente dar. WNT16B ist zur Hervorhebung in Fettdruck aufgeführt. (h) WNT16B-Expression durch qRT-PCR in PSC27-Fibroblasten und Prostatakrebs-Zelllinien nach der angegebenen genotoxischen Exposition im Verhältnis zu den Transkriptmengen vor der Behandlung. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m.

Mitglieder der Wnt-Familie sind an gut beschriebenen mesenchymalen und epithelialen Signalereignissen beteiligt, die Entwicklungsbiologie, Stammzellfunktionen und Neoplasie umfassen²¹. Obwohl es nur wenige Informationen gibt, die die Wnt-Signalübertragung mit Reaktionen auf DNA-Schäden in Verbindung bringen, wurde in einer früheren Studie über eine Überexpression von WNT16B im Zusammenhang mit stress- und onkogen-induzierter Seneszenz berichtet²². Wir bestätigten, dass DNA-Schäden die WNT16B-Proteinexpression erhöhten und fanden erhöhte Mengen an extrazellulärem WNT16B im konditionierten Medium von Prostata-Fibroblasten nach Chemotherapie oder Bestrahlung (Abb. 1e,f). Transkripte, die für andere Mitglieder der Wnt-Familie kodieren, waren in den hier untersuchten Prostatafibroblasten nicht wesentlich verändert (Abb. 1g). Im Gegensatz zu den WNT16B-Reaktionen in Fibroblasten konnten wir in Epithelzellen nur eine geringe Induktion der WNT16B-Expression beobachten (Abb. 1h).

Als nächstes wollten wir bestätigen, dass die Expression von WNT16B durch eine genotoxische Therapie *in vivo* induziert wird. Wir verwendeten die Laser-Capture-Mikrodissektion, um Stroma und Epithel getrennt zu isolieren, und stellten mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) fest, dass die Anzahl der WNT16B-Transkripte im Prostatastroma nach der Chemotherapie um etwa das Sechsfache anstieg ($P < 0,01$) (Abb. 2a und ergänzende Abb. 1d).



Die Expression anderer Gene, von denen bekannt ist, dass sie auf DNA-Schäden reagieren, einschließlich CDKN2A (auch bekannt als p16), CDKN1A (auch bekannt als p21) und IL8, stieg ebenfalls als Reaktion auf die Chemotherapie im Prostatastroma an (Abb. 2a)^{20,23}. Als nächstes bestätigten wir die Induktion der WNT16B-Protein-Expression durch Immunhistochemie. Im Vergleich zu unbehandeltem Prostatagewebe war das WNT16B-Protein nach der Chemotherapie im periglandulären Stroma, das Fibroblasten und glatte Muskelzellen enthält, erheblich und signifikant erhöht ($P < 0,01$) (Abb. 2b,c). Im Gegensatz dazu beobachteten wir eine sehr begrenzte WNT16B-Expression im gutartigen oder neoplastischen Epithel, und die mRNAs, die für andere Proteine der Wnt-Familie kodieren, waren im Prostatastroma nicht wesentlich verändert (ergänzende Abb. 1d,e).

Wir bestätigten diese Ergebnisse bei Brust- und Eierstockkarzinomen, zwei weiteren bösartigen Erkrankungen, die häufig mit zytotoxischer Chemotherapie behandelt werden. Genotoxische Behandlungen induzierten die Expression des WNT16B-Proteins in primären menschlichen Fibroblasten, die direkt aus Brust- und Eierstockgewebe isoliert wurden, sowie in Prostata, Brust und Eierstöcken von Mäusen, die mit MIT behandelt wurden (ergänzende Abb. 2a-d).

Die WNT16B-Proteinexpression war im Stroma menschlicher Brust- und Eierstocktumoren, die mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt wurden, im Vergleich zu Tumoren von Patienten, die keine Behandlung erhielten, signifikant erhöht ($P < 0,001$) (Abb. 2). Bemerkenswert ist, dass bei allen untersuchten Tumorarten eine Bandbreite von fehlender bis starker WNT16B-Expression zu beobachten war. Da das Ansprechen auf die Chemotherapie ebenfalls unterschiedlich ausfiel, untersuchten wir, ob die WNT16B-Expression mit dem klinischen Ergebnis in Verbindung steht. Bei Patienten mit Prostatakrebs, die mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt wurden, war eine höhere WNT16B-Immunreaktivität im Prostatastroma nach der Behandlung mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit eines Krebsrezidivs verbunden ($P = 0,04$) (Abb. 2d). Als Nächstes untersuchten wir, durch welche(n) Mechanismus(e) WNT16B zu einem Therapieversagen beitragen könnte.

WNT16B fördert die Proliferation und Invasion von Krebszellen

Mitglieder der Wnt-Familie beeinflussen zelluläre Phänotypen über β -Catenin-abhängige und -unabhängige Wege²¹. Wir erzeugten einen Prostata-Fibroblasten-Zellstamm mit stabiler Expression von WNT16B (PSC27^{WNT16B}) und Fibroblastenstämme, die shRNAs spezifisch für WNT16B exprimierten (shRNA^{WNT16B}), die die Induktion der WNT16B-Expression durch RAD und MIT blockierten (ergänzende Abb. 3a,b).

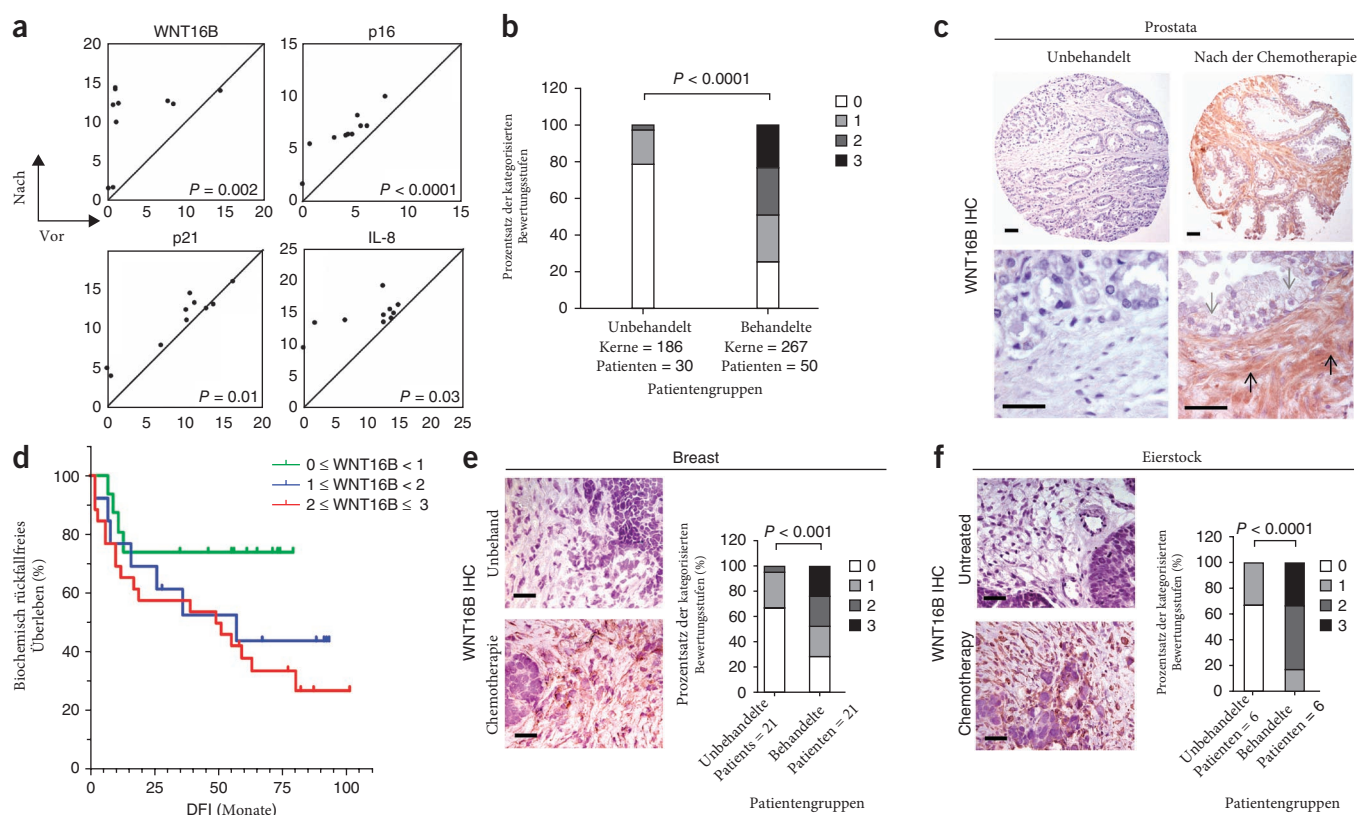


Abbildung 2 Zytotoxische Chemotherapie induziert die WNT16B-Expression in der Mikroumgebung des Tumors. **(a)** Chemotherapie-induzierte Veränderungen der Genexpression im menschlichen Prostatakrebs-assoziierten Stroma, gemessen durch qRT-PCR von mikrodissektierten Zellen. Die Transkriptmengen vor der Behandlung (x-Achse) sind gegen die Transkriptmengen nach der Chemotherapie (y-Achse) desselben Patienten aufgetragen. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Messungen von einem einzelnen Patienten. Die Ergebnisse sind als PCR-Zykluszahl relativ zum ribosomalen Protein L13 (RPL13) angegeben, das als Referenzkontrolle diente. Die P -Werte wurden mit dem Student's t -Test berechnet. **(b)** IHC-Bewertung der prostatastromalen WNT16B-Expression in Prostataktomie-Gewebeproben von Männern mit Prostatakrebs, die entweder unbehandelt ($n = 30$) oder mit Chemotherapie behandelt wurden ($n = 50$). Die Patienten wurden auf der Grundlage ihrer stromalen WNT16B-Färbung in vier Kategorien eingeteilt: 0, keine Expression; 1, schwache oder zweideutige Expression; 2, mäßige Expression; 3, starke Reaktivität. $P < 0,0001$ durch ANOVA. **(c)** Repräsentatives Beispiel einer intensiven WNT16B-Expression im Prostatastroma nach *In-vivo*-Exposition mit MIT und DOC. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen Bereiche des Stromas mit Fibroblasten und glatter Muskulatur. Beachten Sie die minimale WNT16B-Reaktivität im Epithel (graue Pfeile). Maßstabsbalken, 50 μm . **(d)** Kaplan-Meier-Diagramm des biochemischen (Prostata-spezifisches Antigen) rezidivfreien Überlebens basierend auf der Expression von WNT16B im Prostatastroma nach MIT- und DOC-Chemotherapie ($P = 0,04$ durch Log-Rank-Test, der die WNT16B < 1 mit WNT16B ≥ 2 Überlebensverteilungen vergleicht). DFI, krankheitsfreies Intervall nach der Operation. **(e,f)** WNT16B-Färbung von Brust- **(e)** und Ovarialkarzinomen **(f)** von Patienten, die vor der chirurgischen Resektion eine neoadjuvante Chemotherapie oder keine Behandlung erhielten. Die Färbung wird auf einer 4-Punkte-Skala erfasst: 0, keine Expression; 1, schwache oder zweideutige Expression; 2, mäßige Expression; 3, starke Reaktivität. Maßstabsbalken, 50 μm . Die P -Werte wurden durch ANOVA berechnet.

Das mit PSC27^{WNT16B} konditionierte Medium steigerte das Wachstum von Prostatakrebszellen signifikant ($P < 0,01$) (Abb. 3a) und erhöhte die zelluläre Migration und Invasion ($P < 0,05$) im Vergleich zu konditioniertem Medium aus PSC27-Kontrollfibrblasten (PSC27^C) (Abb. 3b und ergänzende Abb. 3c,d), was bestätigt, dass WNT16B phänotypische Veränderungen in Tumorzellen durch parakrine Mechanismen fördern kann.

Das DDSP umfasst ein vielfältiges Spektrum an sekretierten Proteinen, die das Potenzial haben, den Phänotyp benachbarter Zellen zu verändern (Abb. 1c). Als Nächstes wollten wir herausfinden, inwieweit WNT16B für solche Effekte im Zusammenhang mit dem durch DNA-Schäden induzierten Faktorengewebe verantwortlich ist. Das konditionierte Medium von bestrahlten PSC27-Fibrblasten (PSC27-RAD), das das vollständige DDSP repräsentiert, erhöhte die Proliferation (zwischen dem 1,5-fachen und dem 2-fachen, $P < 0,05$) und die Invasivität (zwischen dem 3-fachen und dem 4-fachen, $P < 0,05$) von neoplastischen Epithelzellen im Vergleich zum konditionierten Medium von unbehandelten PSC27-Fibrblasten (Abb. 3c,d). Im Vergleich zu bestrahlten PSC27-Zellen, die Kontroll-shRNAs exprimieren, reduzierte das konditionierte Medium von PSC27-RAD + shRNA^{WNT16B}-Fibrblasten diese Reaktionen auf das vollständige DDSP je nach Zelllinie um 15 bis 35 % ($P < 0,05$) (Abb. 3c,d).

Um die *In-vivo*-Folgen der WNT16B-Expression in der Tumormikroumgebung zu untersuchen, kombinierten wir nichttumorigene BPH1- oder tumorigene PC3-Zellen mit PSC27^{WNT16B} (BPH1+PSC27^{WNT16B} und PC3+PSC27^{WNT16B},) oder PSC27-Kontrollfibrblasten (BPH1+PSC27^C bzw. PC3+PSC27^C) und implantierten die Rekombinanten unter die Nierenkapsel von Empfängermäusen (Abb. 3e). 8 Wochen nach der Implantation waren die BPH1+PSC27^{WNT16B}-Transplantate größer als die BPH1+PSC27^C-Transplantate (~200 mm³ im Vergleich zu ~10 mm³; $P < 0,001$) (ergänzende Abb. 3e). PC3+PSC27^{WNT16B}-Rekombinationen erzeugten sehr große, schlecht differenzierte und invasive Tumore mit einer durchschnittlichen Größe von 500 mm³, die wesentlich größer waren als alle Kontrolltumore ($P < 0,001$) (Abb. 3f und ergänzende Abb. 3f).

In vivo führten PC3-Zellen in Kombination mit PSC27-RAD-Zellen, die das volle Fibroblasten-DDSP exprimieren, zu wesentlich

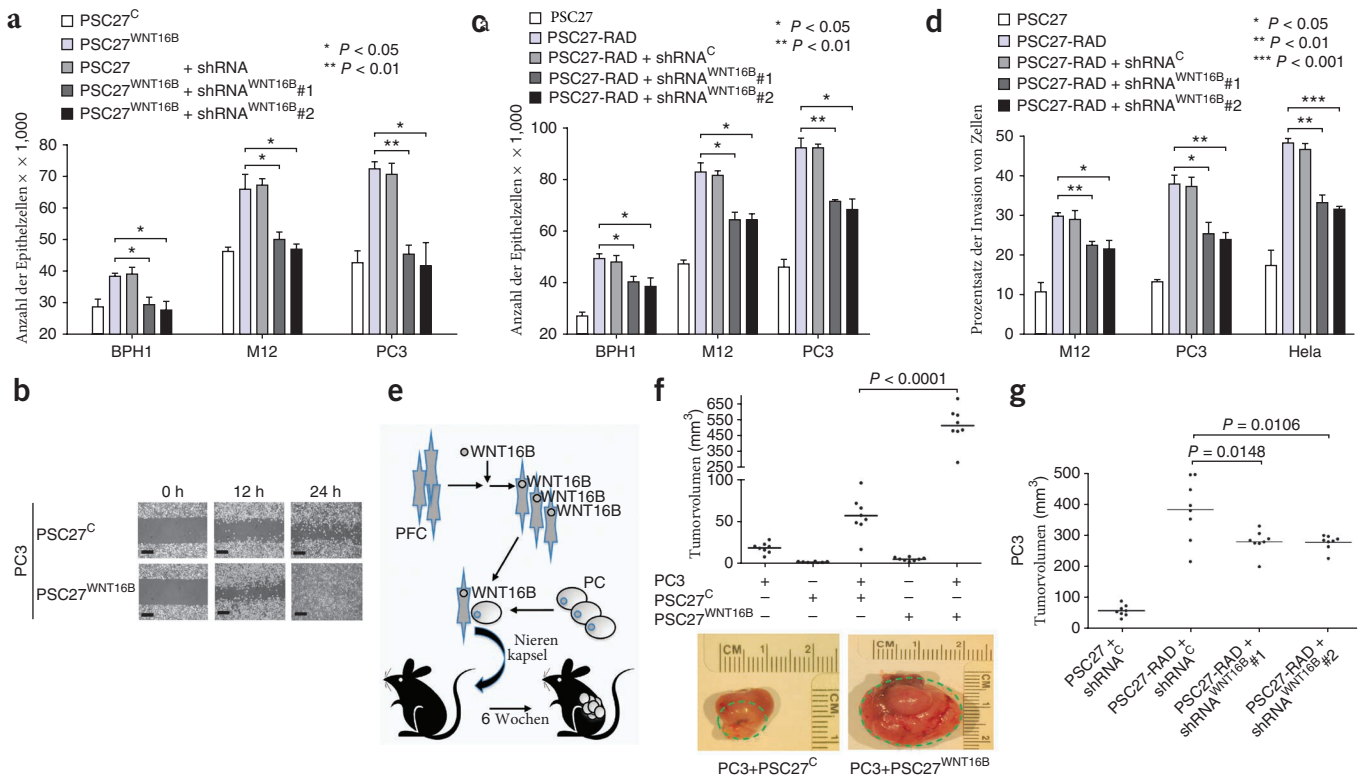


Abbildung 3 WNT16B ist ein wichtiger Effektor des vollständigen DDSP und fördert das Wachstum und die Invasion von Prostatakarzinomen. **(a)** Konditioniertes Medium von WNT16B-exprimierenden Prostata-Fibroblasten (PSC27^{WNT16B}) fördert die Proliferation von neoplastischen Prostata-Epithelzellen. shRNA^C, Kontroll-shRNA; shRNA^{WNT16B}#1 und shRNA^{WNT16B}#2, WNT16B-spezifische shRNAs. **(b)** Kratztest, der die erhöhte Motilität von PC3-Zellen zeigt, die dem konditionierten Medium von Prostata-Fibroblasten ausgesetzt waren, die einen Kontrollvektor (PSC27^C) oder Fibroblasten, die WNT16B exprimieren (PSC27^{WNT16B}), exprimieren. Maßstabsbalken, 100 μ m. **(c)** Das durch Strahlung induzierte vollständige Fibroblasten-DDSP (PSC27-RAD) fördert die Proliferation von tumorigenen Prostataepithelzellen. Die proliferative Wirkung wird durch die Unterdrückung der schadensinduzierten Expression von WNT16B (PSC27-RAD+shRNA^{WNT16B}) deutlich abgeschwächt. **(d)** Das durch Strahlung induzierte, vollständig parakrin wirkende Fibroblasten-DDSP (PSC27-RAD) fördert die Invasion neoplastischer Epithelzellen. Die Invasion wird signifikant abgeschwächt durch die Unterdrückung der schadensinduzierten Expression von WNT16B (PSC27-RAD+shRNA^{WNT16B}). Die Daten in a, c und d sind Mittelwerte \pm s.e.m. von Triplikaten, wobei die *P*-Werte durch ANOVA und anschließenden *t*-Test berechnet wurden. **(e)** Schema des Xenograft-Zell-Rekombinationsexperiments zur Beurteilung der Fähigkeit von WNT16B exprimierenden Fibroblasten, die Prostataumtumorigenese *in vivo* zu beeinflussen. PFC, Prostata-Fibroblastenzellen; PC, Prostatakrebszellen. **(f)** Prostata-Fibroblasten, die so verändert wurden, dass sie WNT16B exprimieren, fördern das Wachstum von Prostatakarzinomen *in vivo*. Dargestellt sind Transplantate der Nebennierenkapsel, die aus PC3-Prostataepithelzellen allein, PC3-Zellen in Kombination mit PSC27^C-Kontrollfibrblasten oder PC3-Zellen in Kombination mit PSC27^{WNT16B}-Fibrblasten bestehen. Die grün gestrichelten Linien geben die Größe des Tumorauswuchses aus der Nierenkapsel an. **(g)** Bestrahlte Prostata-Fibroblasten (PSC27-RAD) fördern das Wachstum von Prostatakarzinomzellen *in vivo*, und dieser Effekt wird durch die Unterdrückung von Fibroblasten-WNT16B mit WNT16B-spezifischen shRNAs (PSC27-RAD+shRNA^{WNT16B}) deutlich abgeschwächt ($P < 0,05$). Dargestellt sind die Tumorumfänge 8 Wochen nach Implantation von PC3- und PSC27-Zelltransplantaten in die Nierenkapsel. In f und g, horizontale Linien bezeichnen den Mittelwert jeder Gruppe von acht Tumoren; und *P*-Werte wurden durch ANOVA, gefolgt von *t*-Test bestimmt.

größeren Tumoren als PC3-Zellen in Kombination mit unbehandelten PSC27-Kontrollfibroblasten ($P < 0,001$) (Abb. 3g). Die Verringerung des WNT16B-Beitrags der Fibroblasten schwächte die PSC27-RAD-Effekte ab: PC3+PSC27-RAD-Transplantate hatten eine durchschnittliche Größe von 380 mm³, während PC3-Zellen in Kombination mit PSC27-RAD +shRNA^{WNT16B} eine durchschnittliche Größe von 280 mm³ aufwiesen, was einer Verringerung der Tumorgöße um 25 % entspricht, wenn WNT16B der Fibroblasten unterdrückt wurde ($P < 0,02$) (Abb. 3g).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die parakrine WNT16B-Aktivität das Tumorstadium *in vivo* fördern kann und eine wesentliche Komponente der gesamten DDSP-Wirkung auf das neoplastische Epithel ausmacht.

WNT16B signalisiert über b-Catenin und induziert eine EMT
Nachdem wir festgestellt hatten, dass WNT16B das Tumorstadium durch parakrine Signale fördern kann, wollten wir als Nächstes den Mechanismus bzw. die Mechanismen bestimmen, durch den bzw. die es dies tut. PSC27^{WNT16B}-konditioniertes Medium aktivierte die kanonische

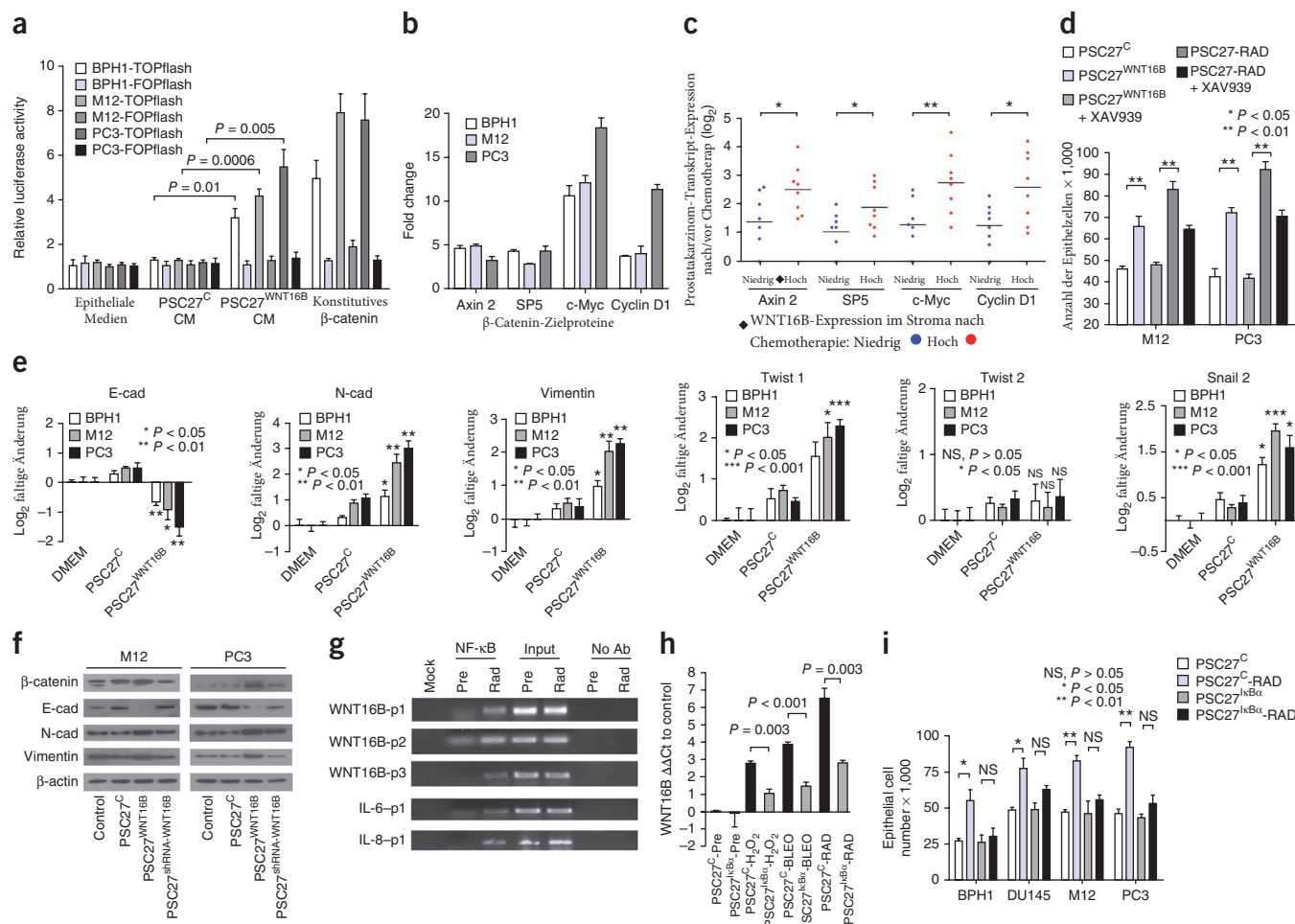


Abbildung 4 Genotoxischer Stress reguliert WNT16B über NF-κB und signalisiert über den kanonischen Wnt-β-Catenin-Signalweg die Proliferation von Tumorzellen und den Erwerb mesenchymaler Eigenschaften. (a) Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Aktivierung eines TCF/LEF-Luciferase-Reporterkonstrukts (TOPflash) oder eines Kontrollreporters (FOPflash). Die Epithelzellen wurden mit konditioniertem Medium (CM) von PSC27-Prostatafibroblasten, die WNT16B (PSC27^{WNT16B}) oder einem Kontrollvektor (PSC27^C) ausgesetzt. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. von Triplikaten, und die P -Werte wurden durch ANOVA, gefolgt von einem t -Test, bestimmt. (b) qRT-PCR-Bewertung der Expression von β-Catenin-Zielgenen in Prostatakrebs-Zelllinien (BPH1, M12 und PC3) vor und 72 Stunden nach Exposition mit PSC27^{WNT16B}-konditioniertem Medium. Die Daten stellen die mittlere \pm s.e.m. fache Veränderung nach im Vergleich zu vor der Exposition für drei Replikate dar. (c) Expression von β-Catenin-Zielgenen in menschlichen Prostatakarzinomen *in vivo* nach neoadjuvanter Behandlung mit MIT und DOC. Die Log₂-Transkriptmengen in den Karzinomzellen nach und vor der Chemotherapie sind im Verhältnis zur niedrigen (blau) oder hohen (rot) WNT16B-Expression im Prostatastroma dargestellt. Jeder Datenpunkt steht für einen einzelnen Patienten; $n = 8$ Patienten. Die horizontalen Balken sind Gruppenmittelwerte. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ durch ANOVA, gefolgt von einem t -Test. (d) Der β-Catenin-Signalweg-Inhibitor XAV939 unterdrückt die Proliferation von Prostatakrebszellen als Reaktion auf PSC27^{WNT16B} CM und schwächt die Reaktion auf das vollständige DDSP in PSC27-RAD-konditioniertem Medium ab. Die Zellzahlen wurden 72 Stunden nach der Behandlung bestimmt. (e) Quantifizierung von Transkripten in neoplastischen Prostataepithelzellen, die für Proteine kodieren, die mit einem EMT-Phänotyp assoziiert sind. Die Messungen stammen von Epithelzellen, die Kontrollmedien (DMEM), Medien, die von PSC27-Fibroblasten (PSC27^C) konditioniert wurden, oder PSC27-Fibroblasten, die WNT16B exprimieren (PSC27^{WNT16B}), ausgesetzt waren. E-cad, E-Cadherin; N-cad, N-Cadherin. (f) Analyse der EMT-assoziierten Proteinexpression durch Western Blot. M12- oder PC3-Zellen wurden Kontrollmedien, Medien konditioniert mit PSC27-Fibroblasten (PSC27^C), PSC27-Fibroblasten, die WNT16B exprimieren (PSC27^{WNT16B}) oder PSC27-Fibroblasten, die WNT16B und shRNA, die auf WNT16B abzielt, exprimieren (PSC27^{shRNA-WNT16B}), ausgesetzt. (g) Chromatin-Immunpräzipitationstests identifizierten NF-κB-Bindungsstellen innerhalb des proximalen Promotors des WNT16B-Gens. PCR-Reaktionsprodukte von Mock (keine DNA-Beladung), NF-κB-Immunpräzipitation, Input-Kontroll-DNA und Kontrolle ohne Antikörper (Ab) vor der Behandlung (Pre) und nach der Bestrahlung (Rad). p1, p2 und p3 bezeichnen Primerpaare, die mutmaßlichen NF-κB-Bindungsregionen in WNT16, IL-6 bzw. IL-8 entsprechen (siehe **ergänzende Methoden** für die Primersequenzen). (h) Analyse der WNT16B-Transkript-Expression mittels qRT-PCR in PSC27-Prostatafibroblasten mit (PSC27^{hkb}) oder ohne (PSC27^C) Hemmung des NF-κB-Signals vor und nach DNA-schädigenden Expositionen. (i) Die Hemmung der NF-κB-Signalübertragung in Fibroblasten, die auf DNA-Schäden reagieren, schwächt die Wirkung des DDSP auf die Tumorzellproliferation ab. Die Zellzahlen wurden 72 Stunden nach RAD-Exposition mit konditioniertem Medium von Fibroblasten mit (PSC27^{hkb}) oder ohne (PSC27^C) Hemmung der NF-κB-Signalübertragung bestimmt. Die Daten in d, e, h und i sind Mittelwerte \pm s.e.m. von Triplikaten, und die P -Werte wurden durch ANOVA, gefolgt von einem t -Test, bestimmt.

Wnt-Signalisierung in BPH1-, PC3- und M12-Prostatakrebszellen, wie durch Assays der β -Catenin-vermittelten Transkription durch T-Zell-Faktor/Lymphoid Enhancer Binding Factor (TCF/LEF) Bindungsstellen gemessen wurde (Abb. 4a). Bekannte β -Catenin-Zielgene, darunter *AXIN2* und *MYC*, wurden nach Exposition mit WNT16B-angereichertem konditioniertem Medium hochreguliert (etwa um das Fünffache bzw. über das Zehnfache) (Abb. 4b). In menschlichen Prostatakarzinomen, die mit Chemotherapie behandelt wurden, lokalisierte sich β -Catenin im Kern der Tumorzellen (ergänzende Abb. 4a). Wir fanden auch, dass β -Catenin tar-get-Gene in Tumoren mit erhöhter stromaler WNT16B-Expression stärker exprimiert wurden als in solchen mit niedriger WNT16B-Expression ($P < 0,05$) (Abb. 4c). Um zu bestätigen, dass die β -Catenin-Signalübertragung zu den epithelialen Phänotypen beiträgt, die sich aus der Exposition gegenüber PSC27-RAD-konditioniertem Medium ergeben, behandelten wir Prostatakrebszellen mit dem Tankyrase-Inhibitor XAV939, der Axin stabilisiert und die β -Catenin-vermittelte Transkription hemmt²⁴. XAV939 unterdrückte die durch WNT16B induzierten proliferativen und invasiven Reaktionen vollständig und schwächte die Auswirkungen des PSC27-RAD-DDSP deutlich ab (Abb. 4d und ergänzende Abb. 4b).

Es ist bekannt, dass Wnt-Signale den Erwerb mesenchymaler Zelleigenschaften fördern, die das migratorische und invasive Verhalten von Epithelzellen durch eine EMT beeinflussen können²⁵⁻²⁷. Der Verlust von CDH1 (auch bekannt als E-Cadherin), dem prototypischen epithelialen Adhäsionsmolekül in Adhäsionsverbindungen, und die verstärkte Expression von CDH2 (auch bekannt als N-Cadherin) gehören zu den wichtigsten Merkmalen einer EMT^{28,29}. Nachdem PC3-Zellen einem mit PSC27^{WNT16B}

konditionierten Medium ausgesetzt wurden, sank die Anzahl der E-Cadherin-Transkripte um 64%, während die Anzahl der N-Cadherin-Transkripte um das Vierfache anstieg ($P < 0,05$). Ähnliche Veränderungen traten in M12- und BPH1-Zellen auf (Abb. 4e,f). Die Hemmung des β -Catenin-Signalwegs mit XAV939 in Epithelzellen blockierte die WNT16B-induzierte EMT-assoziierte Genexpression (ergänzende Abb. 4c). Die Exposition gegenüber PSC27^{WNT16B}-konditioniertem Medium förderte auch mesenchymale Eigenschaften in MDA-MD-231 Brustkrebs- und SKOV3 Eierstockkrebszellen (ergänzende Abb. 4d).

Genotoxischer Stress induziert die WNT16B-Expression durch NF- κ B

Ein wichtiger Weg, der DNA-Schäden mit Apoptose, Seneszenz und DNA-Reparaturmechanismen verbindet, ist die Aktivierung des NF- κ B-Komplexes^{30,31}. NF- κ B spielt auch eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der stressbedingten Induktion von Entzündungsnetzwerken, einschließlich der Hochregulierung und Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) und IL-8 (siehe 23,32). Wir wollten daher herausfinden, ob die durch DNA-Schäden induzierte WNT16B-Expression durch NF- κ B vermittelt wird. Wir identifizierten NF- κ B-Bindungsmotive in der WNT16B-Promotorregion und bestätigten ihre Funktion mit WNT16B-Promotorkonstrukten. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen induzierten sowohl RAD als auch Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), die bekannte NF- κ B-Aktivatoren sind, die WNT16B-Reporteraktivität ($P < 0,01$) (Abb. 4g und ergänzende Abb. 5a-d). Als Nächstes erzeugten wir PSC27-Prostatafibroblasten mit stabiler Expression eines mutierten Nuklearfaktor- κ -Light-Polypeptid-Gen-Enhancers in B-Zellen-Inhibitors, α (I κ B α) (PSC27^{I κ B α}), der den I κ B-Kinase (IKK)-abhängigen Abbau von I κ B α verhindert und somit die NF- κ B-Signalisierung

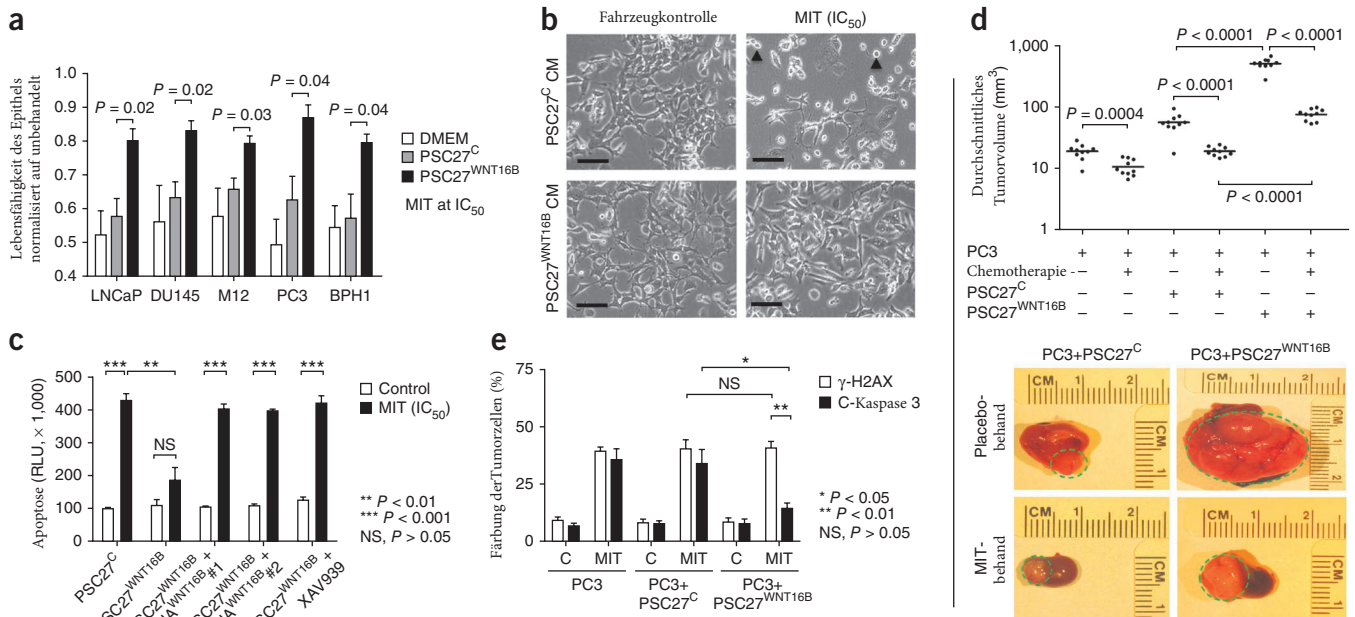
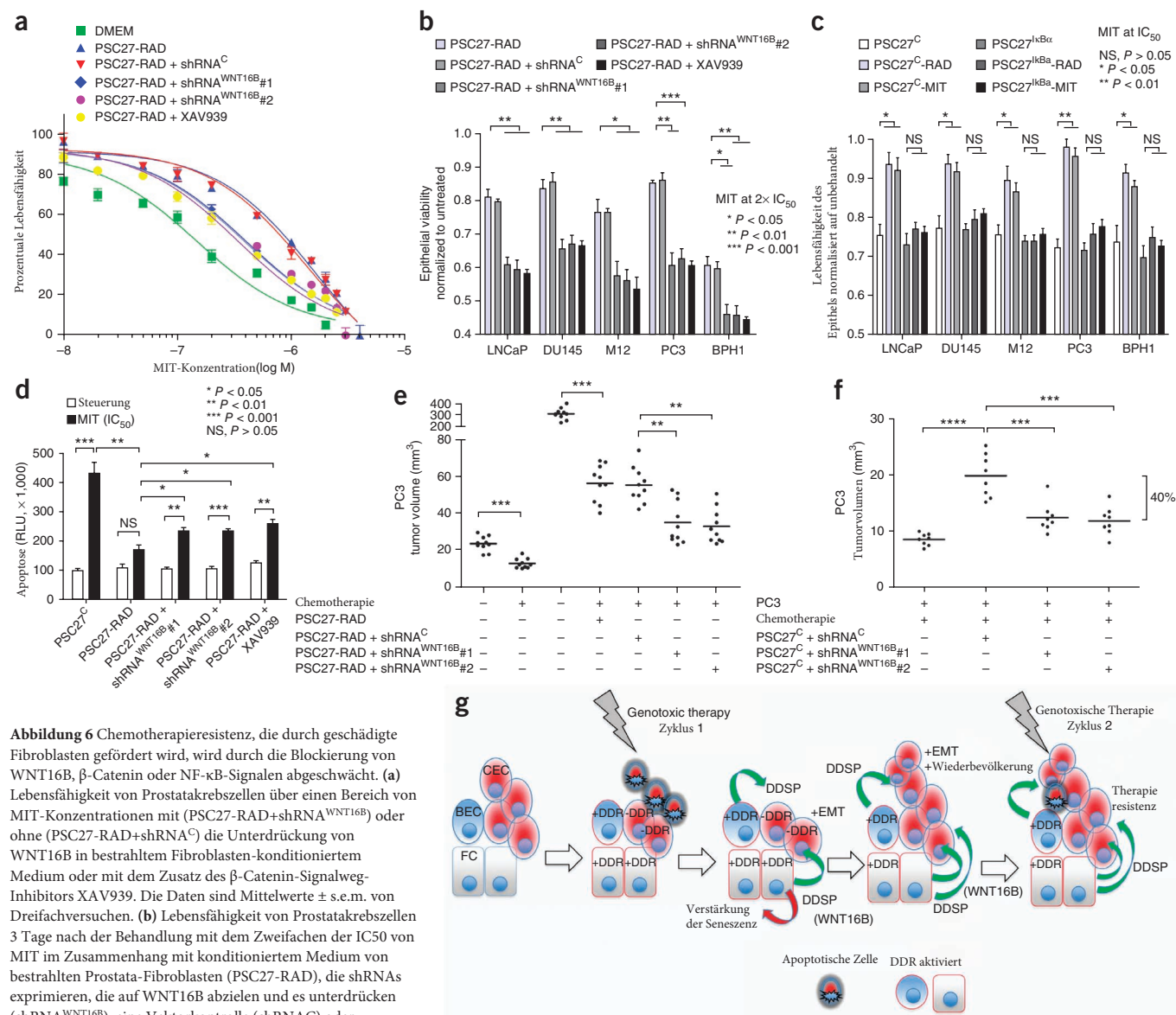


Abbildung 5 Parakrin wirkendes WNT16B fördert die Resistenz von Prostatakarzinomen gegen zytotoxische Chemotherapie. **(a)** Lebensfähigkeit von Prostatakrebszellen 3 Tage nach Behandlung mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration (IC₅₀) von MIT und Medium, das von Fibroblasten mit (PSC27^{WNT16B}) oder ohne (PSC27^C) WNT16B. **(b)** Hellfeldmikroskopische Ansicht von PC3-Zellen, die mit Kontrollmedium oder mit PSC27^{WNT16B}-konditioniertem Medium kultiviert wurden, fotografiert 24 Stunden nach Exposition mit Vehikel oder der IC₅₀ von MIT. Pfeilspitzen kennzeichnen apoptotische Zellkörper. Maßstabsbalken, 50 μ m. **(c)** Akute Reaktionen der Tumorzellen auf die Chemotherapie *in vitro*. Quantifizierung der Apoptose mit Hilfe von Assays, die die kombinierte Caspase-3- und Caspase-7-Aktivität widerspiegeln, gemessen 24 Stunden nach der Exposition von PC3-Zellen gegenüber Vehikel oder der IC₅₀ von MIT. Die Daten in **a** und **c** sind Mittelwerte \pm s.e.m. von dreifachen Experimenten, und die *P*-Werte wurden durch ANOVA, gefolgt von einem *t*-Test, bestimmt. RLU, relative Luziferase-Einheit. **(d)** *In vivo*-Reaktionen von PC3-Tumoren auf MIT-Chemotherapie. Die Transplantate bestanden aus PC3-Zellen allein oder PC3-Zellen in Kombination mit PSC27-Prostatafibroblasten, die einen Kontrollvektor exprimieren (PC3+PSC27^C) oder PSC27-Prostatafibroblasten, die WNT16B exprimieren (PC3+PSC27^{WNT16B}). MIT wurde alle zwei Wochen für drei Zyklen verabreicht. Eine Woche nach der letzten MIT-Behandlung wurden die Transplantate geerntet und das Tumorumfang bestimmt. Jeder Datenpunkt steht für ein einzelnes Xenotransplantat. Die horizontalen Linien sind Gruppenmittelwerte von zehn Tumoren, wobei die *P*-Werte mittels ANOVA und anschließendem *t*-Test ermittelt wurden. **(e)** Akute Reaktion der Tumorzellen auf die Chemotherapie *in vivo*. Quantifizierung der Apoptose durch gesplante Caspase 3 (C-Caspase 3) IHC und von DNA-Schäden durch γ -H2AX-Immunfluoreszenz in PC3- und Fibroblasten-Xenografts, gemessen 24 Stunden nach *In-vivo*-Behandlung mit Vehikel (C) oder MIT. Die Werte beziehen sich auf mindestens 100 gezählte Zellen aus jeweils 3-5 Tumoren pro Gruppe. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m., und die *P*-Werte wurden durch ANOVA, gefolgt von einem *t*-Test, bestimmt.

abschwächt. Nach der Bestrahlung von PSC27-Zellen translozierte NF- κ B in den Zellkern und induzierte die NF- κ B-Reporteraktivität um das >100-fache (**ergänzende Abb. 5d,e**). Im Vergleich dazu war die Menge an nukleärem NF- κ B in PSC27^{tkBa}-RAD-Zellen

deutlich geringer. Die PSC27^{tkBa}-Zellen mit beeinträchtiger NF- κ B-Aktivierung wiesen eine signifikante Abschwächung der Induktion der WNT16B-Expression nach Behandlung mit H₂O₂, BLEO oder RAD auf ($P < 0,05$) (**Abb. 4h**).



kombiniert mit dem β -Catenin-Signalweg-Inhibitor XAV939. (c) Lebensfähigkeit von Prostatakrebszellen 3 d nach Behandlung mit der IC₅₀ von MIT im Zusammenhang mit konditioniertem Medium von Prostata-Fibroblasten, die mit Strahlung (PSC27-RAD) oder MIT (PSC27-MIT) und mit (PSC27^{tkBa}) oder ohne (PSC27^C) die Unterdrückung der NF- κ B-Signalisierung vorbehandelt wurden. (d) Antworten der akuten Tumorzellen auf die Chemotherapie *in vitro*. Quantifizierung der Apoptose durch die Caspase-3- und -7-Aktivität, gemessen 24 Stunden nach der Exposition von PC3-Zellen gegenüber Vehikel oder der IC₅₀ von MIT. Die Daten für **b**, **c** und **d** sind Mittelwerte \pm s.e.m. von Triplikaten, und die P -Werte wurden durch ANOVA gefolgt von einem t -Test bestimmt. (e,f) *In-vivo*-Effekte der MIT-Chemotherapie im Zusammenhang mit der Unterdrückung der Induktion der Expression von WNT16B in Fibroblasten. Die Tumoren bestanden aus PC3-Zellen in Kombination mit bestrahlten (PSC27-RAD) Fibroblasten (e) oder unbestrahlten (PSC27^C) (f) Prostata-Fibroblasten, die shRNAs für WNT16B (shRNA^{WNT16B}) oder eine Vektor-Kontrolle (shRNA^C) exprimieren. MIT wurde alle zwei Wochen für drei Zyklen verabreicht, und die Transplantate wurden geerntet und die Tumorumfänge eine Woche nach der letzten Behandlung bestimmt. Jeder Datenpunkt steht für ein einzelnes Xenotransplantat. Die Tumorumfänge der PSC27^C+shRNA^C-Transplantate in f betragen im Durchschnitt 20 mm³ und die Tumorumfänge der PSC27^C+shRNA^{WNT16B}-Transplantate betragen im Durchschnitt 12 mm³ ($P < 0,001$). Horizontale Linien sind Gruppenmittelwerte, mit $n = 10$ in e und $n = 8$ in f. P -Werte wurden durch ANOVA mit anschließendem t -Test ermittelt. Die Klammergrenzen in f sind die Gruppenmittelwerte für PSC27^C+shRNA^C-Transplantate im Vergleich zu PSC27^C+shRNA^{WNT16B}-Transplantaten, die einen Größenunterschied von 40% aufweisen. Asterisken, wie in der vorherigen Tabelle. (g) Modell für nicht-autonome Therapieresistenzeffekte, die von der Mikroumgebung des Tumors als Reaktion auf genotoxische Krebstherapeutika ausgehen. Die erste Therapieperiode löst eine apoptotische oder Seneszenz-Reaktion in Untergruppen von Tumorzellen aus und aktiviert eine DNA-Schadensreaktion (DDR) in DDR-kompetenten benignen Zellen (+DDR), die die Mikroumgebung des Tumors bilden. Die DDR umfasst ein Spektrum von autokrin und parakrin wirkenden Proteinen, die in der Lage sind, einen Seneszenz-Phänotyp in gutartigen Zellen zu verstärken und die Neubesiedlung des Tumors durch Progression-Signalwege in neoplastischen Zellen zu fördern. Parakrin wirkende sekretorische Komponenten wie WNT16B fördern auch die Resistenz gegenüber nachfolgenden Zyklen zytotoxischer Therapien. CEC, Krebs-Epithelzelle; BEC, gutartige Epithelzelle; FC, Fibroblastenzelle; -DDR, DDR-inkompetente gutartige Zellen.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Unterdrückung der Fibroblasten-NF- κ B-Signalisierung als Reaktion auf DNA-Schäden die proliferativen Effekte des PSC27-RAD-DDSP abschwächen würde. Während PSC27-RAD-konditioniertes Medium die Prostataepithelzellproliferation förderte, war dies bei konditioniertem Medium aus PSC27^{kbBa}-RAD-Zellen nicht der Fall (Abb. 4i). Diese Experimente identifizieren *WNT16B* als ein neues Mitglied des zellulären Genomprogramms, das als Reaktion auf DNA-Schäden durch NF- κ B-Signale reguliert wird.

Parakrines WNT16B schwächt die Wirkung einer zytotoxischen Therapie ab

Die vorangegangenen Experimente legten nahe, dass das parakrin wirkende WNT16B neben den tumorfördernden Effekten auch die Reaktion von Tumoren auf genotoxische Krebstherapien beeinflussen könnte. Um diese Möglichkeit zu prüfen, untersuchten wir MIT, einen Topoisomerase-Inhibitor vom Typ 2, der DNA-Strangbrüche erzeugt und zu Wachstumsstillstand, Seneszenz oder Apoptose führt. Er wird klinisch zur Behandlung von fortgeschrittenem Prostatakrebs eingesetzt. Prostatakrebszellen, die PSC27^{WNT16B}-konditioniertem Medium ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich zum Kontrollmedium durchweg eine signifikante Abschwächung der Chemotherapie-induzierten Zytotoxizität über einen Bereich von MIT-Konzentrationen nach 3 d ($P < 0,05$) (Abb. 5a und ergänzende Abb. 6a). Kurzfristige Zelllebensfähigkeitstests bestätigten, dass das mit PSC27^{WNT16B} konditionierte Medium im Vergleich zu den Kontrollen das Überleben der Krebszellen nach einer akuten 12-stündigen Exposition gegenüber MIT verbesserte ($P < 0,01$) (ergänzende Abb. 6b). Apoptotische Reaktionen, die nach 24-stündiger MIT-Exposition gemessen wurden, wurden durch PSC27^{WNT16B}-konditioniertes Medium erheblich abgeschwächt ($P < 0,01$), ein Effekt, der durch die Behandlung mit XAV939 blockiert wurde (Abb. 5b,c). Um festzustellen, ob diese Beobachtungen für die Tumorthherapie *in vivo* von Bedeutung sind, behandelten wir Mäuse mit Tumortransplantaten, die aus PC3-Zellen und PSC27^{WNT16B}- oder PSC27^C-Fibroblasten bestanden, mit drei Zyklen von MIT, die alle zwei Wochen verabreicht wurden. Die MIT-Behandlung führte zu einer deutlichen Verringerung des Tumorumfanges ($P < 0,001$). Die Transplantation von Tumorzellen mit PSC27^{WNT16B}-Fibroblasten schwächte jedoch die tumorhemmende Wirkung von MIT im Vergleich zu Tumorzellen ab, die mit PSC27-Kontrollfibroblasten transplantiert wurden: Die Tumoren von PC3 + PSC27^C und PC3 + PSC27^{WNT16B} hatten eine durchschnittliche Größe von 13 mm³ bzw. 78 mm³ ($P < 0,001$) (Abb. 5d). Experimente mit MDA-MB-231 Brustkrebszellen und Brustfibroblasten ergaben ähnliche Ergebnisse (ergänzende Abb. 6c). Um den Einfluss von WNT16B auf die akuten Auswirkungen der Chemotherapie zu bewerten, untersuchten wir Kohorten von PC3 + PSC27^C- und PC3 + PSC27^{WNT16B}-Xenografts 24 Stunden nach der MIT-Behandlung, um DNA-Schäden mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz und Apoptose mittels gespaltener Caspase 3-Immunhistochemie (IHC) zu quantifizieren. Im Vergleich zu PC3 + PSC27^C-Transplantaten gab es keinen Unterschied in der Anzahl der DNA-Schadensherde in PC3 + PSC27^{WNT16B}-Tumoren, aber es waren signifikant weniger apoptotische Zellen vorhanden (34 % im Vergleich zu 14 %; $P < 0,05$) (Abb. 5e).

Das konditionierte Medium von PSC27-RAD-Zellen, das das vollständige Fibroblasten-DDSP repräsentiert, erhöhte signifikant die Lebensfähigkeit von PC3-Krebszellen, die *in vitro* MIT-Konzentrationen zwischen 0,1-1 μ M ausgesetzt waren ($P < 0,01$) (Abb. 6a). Im Vergleich zu PSC27-RAD-konditioniertem Medium verstärkten PSC27-RAD + shRNA^{WNT16B}- oder PSC27^{kbBa}-RAD-Fibroblasten, die so manipuliert wurden, dass sie die WNT16B-Expression bzw. die NF- κ B-Aktivierung unterdrückten, die Wirkung von MIT erheblich, indem sie die Apoptose weiter erhöhten und die Lebensfähigkeit der Tumorzellen um 30-40 % reduzierten. Die Blockierung der β -Catenin-Signalübertragung in Karzinomzellen mit XAV939 schwächte auch die Auswirkungen des PSC27-RAD-konditionierten Mediums auf die Förderung des Überlebens von Tumorzellen ab (Abb. 6b-d und ergänzende Abb. 7a,b). Diese Wirkung von WNT16B war auch *in vivo* zu beobachten. PC3 + PSC27-RAD-Tumortransplantate hatten eine durchschnittliche Größe von 300 mm³ im Vergleich zu 25 mm³ bei Transplantaten mit PC3-Zellen allein ($P < 0,001$). Die MIT-Chemotherapie unterdrückte das Wachstum der PC3 + PSC27-RAD-Transplantate, obwohl Resttumore immer noch leicht nachweisbar

waren und eine durchschnittliche Größe von 55 mm³ aufwiesen (Abb. 6e). Nach der MIT-Behandlung waren die Resttumore von PC3-Zellen mit PSC27-RAD + shRNA^{WNT16B}-Fibroblasten mit abgeschwächter WNT16B-Induktion jedoch im Durchschnitt ~33% kleiner als PC3 + PSC27-RAD-Tumore ($P < 0,001$) (Abb. 6e). Experimente mit MDA-MD-231-Zellen und Brustfibroblasten ergaben ähnliche Ergebnisse (ergänzende Abb. 7c). Um die klinische Situation der Krebstherapie genauer zu imitieren, verpflanzten wir auch Tumorzellen mit unbestrahlten PSC27-Fibroblasten (PSC27^C) und folgten demselben Behandlungsschema von drei MIT-Zyklen. Die Tumore von Mäusen, die mit MIT behandelt wurden, waren wesentlich kleiner als die Tumore von unbehandelten Mäusen ($P < 0,001$). Die Abschwächung der WNT16B-Induktion verstärkte die Wirkung der Chemotherapie weiter: Nach der MIT-Behandlung waren Transplantate aus PC3-Zellen und PSC27^C + shRNA^{WNT16B} im Durchschnitt 40 % kleiner als Transplantate aus PC3-Zellen kombiniert mit PSC27^C-Zellen ohne shRNA^{WNT16B} ($P < 0,001$) (Abb. 6f und ergänzende Abb. 7d).

DISKUSSION

Die Optimierung der Strahlen- und Chemotherapie zur Behandlung bösartiger Neoplasmen beruht auf der iterativen Entwicklung und Prüfung von Modellen, die die Dynamik des Tumorwachstums, die Mutationsraten und die Kinetik der Zellabtötung berücksichtigen. Die theoretisch wirksamsten Tumorbekämpfungsstrategien müssen jedoch in der Regel wegen der nachteiligen Auswirkungen auf den Wirt abgeschwächt werden. Diese Tatsache hat zur Entwicklung von Therapieschemata geführt, bei denen die Therapien in Intervallen oder Zyklen verabreicht werden, um irreparable Schäden an lebenswichtigen Wirtsfunktionen zu vermeiden. Die Erholung und Wiederbesiedlung von Tumorzellen zwischen den Behandlungszyklen ist jedoch eine der Hauptursachen für das Scheitern der Behandlung^{15,16}. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass sich die Wiederbesiedlungsrate von Tumorzellen in den Intervallen zwischen erfolgreichen Behandlungen beschleunigt, und bei soliden Tumoren kommt es häufig zu einem anfänglichen Ansprechen, gefolgt von einem schnellen Wiederwachstum und einer anschließenden Resistenz gegen weitere Chemotherapien. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Schadensreaktionen in gutartigen Zellen, die die Mikroumgebung des Tumors bilden, direkt zu einer verbesserten Tumorstadiumskinetik beitragen können (Abb. 6g).

Die autokrin und parakrin wirkenden Einflüsse genotoxischer Stressreaktionen können komplexe und potenziell widersprüchliche, nicht autonome Auswirkungen auf Zellen haben^{33,34}. Insgesamt stimmen unsere Ergebnisse mit Studien über DNA-Schäden überein, bei denen die Ausführung eines Signalprogramms, das in einem Seneszenz-Phänotyp gipfelt, von erhöhten Konzentrationen spezifischer extrazellulärer Proteine begleitet wird, die als „Seneszenz-Botschaftssekretom“ oder „Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp“ bezeichnet werden^{33,34}. DNA-Schadensreaktionen und Seneszenzprogramme können eindeutig auf zellautonome „intrinsische“ Weise wirken, um das Zellwachstum zu stoppen und die Tumorstadiumsprogression zu hemmen, wie dies bei prä-malignen Nävi beobachtet wurde³⁵. Sekretierte Faktoren wie das Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Bindungsprotein 7 (IGFBP7) und die Chemokin-(C-X-C-Motiv)-Rezeptor-2-(CXCR2)-Liganden IL-6 und IL-8 sind an einer positiven Rückkopplungsschleife beteiligt, um den durch onkogenen Stress induzierten Seneszenz-Wachstumsstopp zu verstärken und auch Immunreaktionen zu fördern, die senescente Zellen besitzigen und die Tumorstadiumsprogression verbessern^{23,32,36,37}. Neben proinflammatorischen Zytokinen umfasst das Schadensreaktionsprogramm jedoch auch Proteasen und mitogene Wachstumsfaktoren wie MMPs, Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Liganden des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), die eindeutig eine Rolle bei der Förderung des Tumorstadiums, der Hemmung der Zelldifferenzierung, der Verstärkung der Angiogenese und der Beeinflussung der Behandlungsresistenz spielen^{19,20,38}. Dieses Konzept wird durch Berichte über gewebespezifische chemoresistente Überlebensnischen bei hämatopoetischen Neoplasmen, wie z. B. Lymphomen, unterstützt³⁹. Die Situation weist auch Parallelen zu Studien auf, in denen Strahlen- und Chemotherapie paradoxerweise die Tumorausbreitung fördern⁴⁰.

Insgesamt stützen diese Studien mehrere Schlussfolgerungen: Erstens hängen die Ergebnisse einer genotoxischen Exposition gegenüber einer bestimmten gutartigen oder neoplastischen Zelle von der Integration der angeborenen Fähigkeiten zur Schadensbehebung und dem Kontext ab, der durch die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung bestimmt wird; Zweitens kann eine erworbene Resistenz auch ohne Veränderungen der intrinsischen zellulären Chemosensitivität auftreten, obwohl eine intrinsische Medikamentenresistenz bei einigen Krebsarten eindeutig vorhanden ist⁴¹, und unsere Ergebnisse unterstützen nachdrücklich frühere Studien, in denen Bestandteile der Tumormikroumgebung als wichtige Faktoren für diese Resistenz identifiziert wurden⁴²⁻⁴⁴; und drittens sind spezifische DDSP-Proteine der Mikroumgebung, die die Therapieresistenz fördern, wie WNT16B, attraktive Ziele für die Verstärkung der Reaktion auf allgemeinere genotoxische Therapeutika. Die Komplexität des Schadensreaktionsprogramms spricht jedoch auch für Strategien, die sich auf die Hemmung von vorgelagerten Hauptregulatoren wie NF- κ B45 konzentrieren, die möglicherweise effizientere und wirksamere Ergänzungen zu zytotoxischen Therapien darstellen, sofern ihre Nebenwirkungen erträglich sind.

METHODEN

Die Methoden und alle zugehörigen Referenzen sind in der Online-Version des Papiers verfügbar.

Zugriffsnummern. Die Microarray-Daten sind in der Gene Expression Omnibus-Datenbank unter dem Zugangscode GSE26143 hinterlegt.

Hinweis: Ergänzende Informationen sind in der Online-Version des Papiers verfügbar.

DANKSAGUNGEN

Wir danken J. Dean und D. Bianchi-Frias für hilfreiche Kommentare, A. Moreno für die administrative Unterstützung und N. Clegg für die bioinformatische Unterstützung. S. Hayward, Vanderbilt University, und J. Ware, Medical College of Virginia, stellten BPH1- bzw. M12-Zellen zur Verfügung. Primäre humane Prostata-(PSC27), Ovarial- (OVF28901) und Brustfibroblasten (HBF1203) wurden bereitgestellt von B. Knudsen, Cedars Sinai Medical Center, E. Swisher, University of Washington, und P. Porter über das Seattle Breast SPORE (P50 CA138293), Fred Hutchinson Cancer Research Center, bereitgestellt. B. Torok-Storob, Fred Hutchinson Cancer Research Center, stellte HS5 und HS27A HPV E6/E7 immortalisierte humane Knochenmarkstromazellen zur Verfügung. Wir danken den Klinikern die an den Studien zur neoadjuvanten Chemotherapie teilgenommen haben: M. Garzotto, T. Takayama, P. Lange, W. Ellis, S. Lieberman und B. A. Lowe. Wir sind auch dankbar für die Teilnahme der Patientinnen und ihrer Familien an diesen Studien. Die Brustkrebsproben wurden vom Fred Hutchinson Cancer Research Center/University of Washington Medical Center Breast Specimen Repository bezogen. Wir danken N. Urban, Fred Hutchinson Cancer Research Center, für die Bereitstellung von Eierstockkrebs-Bioproben, die durch den POCRC SPORE Grant P50CA83636 finanziert wurden. Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des Verteidigungsministeriums (PC073217), R01CA119125, das National Cancer Institute Tumor Microenvironment Network U54126540, das Pacific Northwest Prostate Cancer SPORE P50CA097186 und die Prostate Cancer Foundation unterstützt.

BEITRÄGE DER AUTOREN

Y.S. plante und führte die Experimente durch und schrieb das Manuskript. J.C. stellte Reagenzien und technische Beratung zur Verfügung. C.H., T.M.B. und P.P. stellten klinisches Material für die Bewertung der Behandlungsreaktionen zur Verfügung. I.C. analysierte die Daten. L.T. analysierte die Gewebesthistologie und die immunhistochemischen Tests. P.S.N. plante die Experimente, analysierte die Daten und verfasste das Manuskript.

KONKURRIERENDE FINANZIELLE INTERESSEN

Die Autoren erklären, dass sie keine konkurrierenden finanziellen Interessen haben.

Online veröffentlicht unter <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2890>.
Informationen über Nachdrucke und Genehmigungen sind online verfügbar unter <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Longley, D.B. & Johnston, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* **205**, 275–292 (2005).
- Wang, T.L. *et al.* Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3089–3094 (2004).

- Schmitt, C.A., Rosenthal, C.T. & Lowe, S.W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat. Med.* **6**, 1029–1035 (2000).
- Helmrich, A. *et al.* Recurrent chromosomal aberrations in INK4a/ARF defective primary lymphomas predict drug responses *in vivo*. *Oncogene* **24**, 4174–4182 (2005).
- Redmond, K.M., Wilson, T.R., Johnston, P.G. & Longley, D.B. Resistance mechanisms to cancer chemotherapy. *Front. Biosci.* **13**, 5138–5154 (2008).
- Wilson, T.R., Longley, D.B. & Johnston, P.G. Chemoresistance in solid tumours. *Ann. Oncol.* **17** (suppl. 10), x315–x324 (2006).
- Lee, S. & Schmitt, C.A. Chemotherapy response and resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 90–96 (2003).
- Sakai, W. *et al.* Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* **451**, 1116–1120 (2008).
- Kobayashi, H. *et al.* Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3294–3298 (1993).
- Waldman, T. *et al.* Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat. Med.* **3**, 1034–1036 (1997).
- Samson, D.J., Seidenfeld, J., Ziegler, K. & Aronson, N. Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3618–3630 (2004).
- Croix, B.S. *et al.* Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1285–1296 (1996).
- Kerbel, R.S. Molecular and physiologic mechanisms of drug resistance in cancer: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 1–2 (2001).
- Wang, F. *et al.* Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1494–1503 (2002).
- Kim, J.J. & Tannock, I.F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 516–525 (2005).
- Trédan, O., Galmarini, C.M., Patel, K. & Tannock, I.F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1441–1454 (2007).
- Garzotto, M., Myrthue, A., Higan, C.S. & Beer, T.M. Neoadjuvant mitoxantrone and docetaxel for high-risk localized prostate cancer. *Urol. Oncol.* **24**, 254–259 (2006).
- Beer, T.M. *et al.* Phase I study of weekly mitoxantrone and docetaxel before prostatectomy in patients with high-risk localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1306–1311 (2004).
- Bavik, C. *et al.* The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* **66**, 794–802 (2006).
- Coppé, J.P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 2853–2868 (2008).
- Clevers, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
- Binet, R. *et al.* WNT16B is a new marker of cellular senescence that regulates p53 activity and the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Res.* **69**, 9183–9191 (2009).
- Acosta, J.C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
- Huang, S.M. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. & Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
- Yook, J.I. *et al.* A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1398–1406 (2006).
- Vincan, E. & Barker, N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 657–663 (2008).
- Wu, K. & Bonavida, B. The activated NF- κ B-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 241–254 (2009).
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–428 (2007).
- Bernard, D. *et al.* Involvement of Rel/nuclear factor- κ B transcription factors in keratinocyte senescence. *Cancer Res.* **64**, 472–481 (2004).
- Berchtold, C.M., Wu, Z.H., Huang, T.T. & Miyamoto, S. Calcium-dependent regulation of NEMO nuclear export in response to genotoxic stimuli. *Mol. Cell Biol.* **27**, 497–509 (2007).
- Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
- Kuilman, T. & Peeper, D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94 (2009).
- Fumagalli, M. & d'Adda di Fagagna, F. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat. Cell Biol.* **11**, 921–923 (2009).
- Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).
- Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
- Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M. & Green, M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363–374 (2008).

38. Coppé, J.P., Kauser, K., Campisi, J. & Beausejour, C.M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* **281**, 29568–29574 (2006).
39. Gilbert, L.A. & Hemann, M.T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* **143**, 355–366 (2010).
40. Biswas, S. *et al.* Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J. Clin. Invest.* **117**, 1305–1313 (2007).
41. Davis, A.J. & Tannock, J.F. Repopulation of tumour cells between cycles of chemotherapy: a neglected factor. *Lancet Oncol.* **1**, 86–93 (2000).
42. Meads, M.B., Hazlehurst, L.A. & Dalton, W.S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2519–2526 (2008).
43. Shree, T. *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* **25**, 2465–2479 (2011).
44. DeNardo, D.G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **1**, 54–67 (2011).
45. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* **25**, 2125–2136 (2011).

ONLINE-METHODEN

Zellkulturen und Behandlungen. Wir erhielten Epithelzelllinien von der American Type Culture Collection und kultivierten sie nach den empfohlenen Protokollen. Die Fibroblasten wurden gezüchtet, bis sie zu 80 % konfluent waren, und dann mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid (PSC27-H₂O₂), 10 µg ml⁻¹ Bleomycin (PSC27-BLEO), 1 µM Mitoxantron (PSC27-MIT) oder ionisierender Strahlung durch eine ¹³⁷Cäsiumquelle bei 743 rad min⁻¹ (PSC27-RAD) behandelt. Weitere Einzelheiten zu den Zellkulturmethoden sind in den **ergänzenden Methoden** enthalten.

Analyse der Genexpression. Wir extrahierten die gesamte RNA aus PSC27-Zellen mit dem RNeasy-Kit (QIAGEN), wandelten die mRNAs in komplementäre DNAs (cDNAs) um und amplifizierten die cDNAs in einer Runde mit dem MessageAmp aRNA-Kit (Ambion), gefolgt von der Aminoallyl-UTP-Inkorporation in einer zweiten Runde der Amplifikation der RNA. Die Proben wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gemäß den Anweisungen des Herstellers (Agilent Technologies) auf 44K Whole Human Genome Expression Microarray Objektträger hybridisiert. Zusätzliche Untersuchungen der Transkriptabundanz wurden mittels qRT-PCR durchgeführt (**ergänzende Methoden**).

Immunhistochemie. Wir verwendeten einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen WNT16B (Produktnummer 552595, Klon F4-1582, BD Pharmingen) in einer Verdünnung von 1:16.000 zur Immunlokalisierung des WNT16B-Proteins mit einer indirekten dreistufigen Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode gemäß den Anweisungen des Herstellers (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Labs). Die Expression von WNT16B durch Epithel oder fibromuskuläre Stromazellen in jedem Gewebeschnitt wurde auf einer 4-Punkte-Skala wie folgt erfasst: 3 für stark exprimiert, 2 für mäßig exprimiert, 1 für schwach oder mehrdeutig exprimiert und 0 für keine Expression von WNT16B durch irgendwelche Stromazellen. Weitere Einzelheiten sind in den **ergänzenden Methoden** enthalten.

Charakterisierung der Zellphänotypen. Wir bewerteten die Zellproliferation mit dem CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), wobei die Signale mit einem 96-Well-Plattenlesegerät erfasst wurden. Für Transwell-Migrations- und Invasionstests wurden serumstarrende Zellen in die oberen Kammern von Cultrex 24-Well Cell Migration Assay-Platten (8 µm Porengröße) gegeben, die mit oder ohne Basenmembran-Extrakt beschichtet waren, der als 0,5-fache Stammlösung hergestellt wurde. Nach 12 bzw. 24 Stunden wurden die migrierenden oder eindringenden Zellen in den unteren Kammern angefärbt und die Absorption der Platte aufgezeichnet. Chemoresistenztests wurden mit Epithelzellen durchgeführt, die entweder mit DMEM und niedrigem Serum (0,5 % FCS) (hier als „DMEM“ bezeichnet) oder mit konditioniertem Medium kultiviert wurden, das aus PSC27-Zellen gewonnen wurde, die Vektorkontrollen, WNT16B oder shRNAs exprimieren. Die Zellen wurden 12, 24 oder 72 Stunden lang mit Mitoxantron in Konzentrationen nahe der IC₅₀ jeder einzelnen Zelllinie behandelt.

Der prozentuale Anteil lebensfähiger Zellen wurde berechnet, indem die Ergebnisse jedes Experiments mit den Ergebnissen der mit Vehikel behandelten Zellen verglichen wurden. Jeder Test wurde mindestens dreimal wiederholt, wobei die Ergebnisse als Mittelwerte ± s.e.m. angegeben wurden.

In-vivo-Studien. Das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) des Fred Hutchinson Cancer Research Center prüfte und genehmigte die Tierprotokolle und -verfahren, wobei die Operationen gemäß dem Leitfaden für Labortiere der US National Institutes of Health durchgeführt wurden. Zur Herstellung von Gewebekombinationen wurden 250.000 Fibroblasten (PSC27-Serie) und Epithelzellen im Verhältnis 1:1 in Kollagenen gemischt. Männliche ICR-Mäuse mit schwerem kombiniertem Immundefizit (SCID), die von Taconic, Inc. bezogen wurden, wurden mit Isofluran betäubt, und es wurde ein schräger Einschnitt (<1 cm) an der Nierenkapseloberfläche parallel und neben der Längsachse jeder Niere vorgenommen. Die Zellen wurden mit einer stumpfen 25-Gauge-Nadel und einer Hamilton-Glasspritze unter die Kapsel injiziert. Die Niere wurde in den Retroperitonealraum zurückgebracht, und die Haut wurde mit chirurgischen Klammern verschlossen. Das Wachstum der Xenotransplantate wurde in wöchentlichen Abständen überprüft, und die Mäuse wurden 8 Wochen nach der Transplantation getötet. Jeder Xenotransplantat-Arm umfasste 5-8 Mäuse pro Xenotransplantat-Typ, entweder aus einzelnen Zellen oder aus Kombinationen von Fibroblasten und Epithelzellen. Weitere Einzelheiten sind in den **ergänzenden Methoden** enthalten.

Für die Chemotherapiestudien erhielten die Mäuse Zelltransplantate wie oben beschrieben und wurden 2 Wochen lang beobachtet, damit sich der Tumor entwickeln konnte. Ab der dritten Woche nach der Transplantation erhielten die Mäuse Mitoxantron in einer Dosis von 0,2 mg pro kg intraperitoneal am ersten Tag der dritten, fünften und siebten Woche (Ref. 46). Insgesamt wurden drei zweiwöchige Zyklen verabreicht, nach denen die Mäuse getötet und ihre Nieren für Tumormessungen und histologische Analysen entfernt wurden. Jeder Versuchsarm umfasste 5-8 Mäuse pro Behandlungskohorte. Weitere Einzelheiten sind in den **ergänzenden Methoden** zu finden.

Statistische Analysen. Alle In-vitro-Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt, und die Daten werden als Mittelwerte ± s.e.m. angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen und Behandlungen wurden durch ANOVA, gefolgt von t-Tests, bestimmt. $P \leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Zusätzliche Methoden. Die detaillierte Methodik ist in den **ergänzenden Methoden** beschrieben.

46. Alderton, P.M., Gross, J. & Green, M.D. Comparative study of doxorubicin, mitoxantrone, and epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. *Cancer Res.* **52**, 194–201 (1992).