# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

# Untersuchung zur Funktion von onkogenem K-ras in der intestinalen Karzinogenese mit besonderem Bezug auf Seneszenz und Proliferation

Moritz W. Bennecke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	UnivProf. Dr. J. J. Hauner
Prüfer der Dissertation:	
	1. UnivProf. Dr. M. Schemann
	2. PrivDoz. Dr. F. Greten

Die Dissertation wurde am 08.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.03.2010 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Das kolorektale Karzinom	
1.1.1 Epidemiologie	
1.1.2 Aetiologie	
1.2 Entstehungsmechanismen unterschiedlich klassifizierter Kolontumore	5
1.2.1 Tumoren mit chromosomaler Instabilität: Das Vogelsteinmodell	
1.2.2 Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität	
1.2 Alternative Signalwage gun Knaheentstehung	Q
1.3 Alternative Signalwege zur Krebsenistenung	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
1.3.2 Der serratierte Signalweg	00 Q
1.3.2.1 Hyperplastische Polypen (HP)	
1.3.2.2 Traditionelle serratierte Adenome (TSA)	
1.3.2.3 Sessile serratierte Adenome (SSA)	
1.3.2.4 Mixed Polyp (MP)	
1.3.2.5 Serratiertes Adenokarzinom	
1.4 Signalkaskaden in der Karzinogenese	
1.4.1 Der Wnt-Signalweg: Initiator der klassischen kolorektalen Karzinogenese	
1.4.2 Die Ras-Signalkaskade in der Karzinogenese	
15 Onlyaganag V mag	17
1.5 Olikogenes A-ras	
1.5.2 Die LSI-K-ras <sup>GI2D</sup> -Maus	
2. Fragestellung und Zielsetzung	22
2 Matarial und Mathadan	22
<b>5.</b> Material ullu Methodell	
3.1 Mäuse	
3.1.1 LSL-K-ras <sup>G12D</sup> und K-ras <sup>G12Dint</sup>	
$3.1.2 \text{ K-ras}^{G12Dint}/Tp53^{}$	
$3.1.3 \text{ K-ras}^{-120 \text{ m}}/\text{Ink}4a/\text{Arf}'$	
3.1.4  K-ras /Ink4a/Arf /Ip35	
3.1.6 Genotypisierung	24
3.1.7 Magnetresonanztomographie (MRT)	
3.1.8 BrdU (Bromdesoxyuridin)-Injektion	
3.1.9 AOM (Azoxymethan)-Injektion	
3.1.10 Alter der für die Experimente verwendeten Tiere	
3.1.11 Anfertigung von Darmrollen	
3.1.12 Gewebeproben/Tumorproben	
3.2 Histologische Färbungen	
3.2.1 Methylenblau Färbung	
3.2.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung (H+E)	
3.2.3 Alcianblue Färbung	
3.2.4 Azure-Eosin Färbung	
3.2.5 SA-β-Galaktosidase Färbung	
3.2.0 Immunonistochemische Farbungen (IHC)	
3.2.8 TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)	31
5.2.6 TOTALE Fullburg (TOT incoluted do TT bloth inck end hubering)	
3.3 KNA/DNA Analysen	
5.5.1 KNA Isolation	
3.3.2 MICTORITRY ANRIYSE	
2.2.4 DT DCD	41
.)).4 N I -F UN	
3.3.5 DNA Extraction	

3.3.6 Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten	
3.3.7 Laser-Mikrodissektion (Laser capture microdissection (LCM))	
3.3.8 Methylierungsanalyse von DNA aus Mausgewebe	
3.4 Klonierung	
3.4.1 Mutationsanalyse von TP53. <i>B-catenin</i> und TefßRII	
3.4.2 Klonierung für die Herstellung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen	
3.4.3 Ligation	
3.4.4 Transformation	
3.4.5 Miniprep und Plasmid DNA Isolation aus Bakterien	
3.5 Proteinbiochemie	36
3.5.1 Isolation von intestinalen Epithelzellen	
3.5.2 Proteinlyse	
3.5.3 Westernblot	
3.5.4 Kinase Assay	39
3.5.5 Herstellung von rekombinaten GST-Fusionsproteinen für den Kinase Assay	
3.5.6 Ras-Assay	
3.5.7 Ral Assay	
3.5.8 DNA-Affinitäts Präzipitations-Assay (DAPA)	
3.6 Zellkultur	43
3.6.1 Isolation von Tumorzellen aus dem Kolon zur Kultivierung in vitro	<b></b> 13
3.6.2 Kultivierung von Tumorzellen	
3.7 Statistische Auswertungen	
3.7.1 Bestimmung der Darmlänge	
3.7.2 Bestimmung der Villuslänge	
3.7.3 Bestimmung der Proliferationsrate	
3.7.4 Signifikanzen	
5.7.5 Migrationsrate der Epitheizenen	
3.8 Methoden zur Untersuchung von humanen Geweben und Mikrosatelliteninst	abilitäts
(MSI)-Analyse	
3.8.1 MSI-Analyse	
3.8.2 <i>KRAS</i> Mutationsanalyse und Pyrosequenzierung	
3.8.3 <i>Tp53</i> Mutationsanalyse	
3.8.4 Promotermethylierung von <i>p10INK</i> ( <i>CDKN2A</i> )	
3.9 Anhang Methoden	
3.9.1 Verwendete Antikörper:	
3.9.1.1 Immunblotanalyse	
3.9.1.2 Immunohistochemie und Immunfluoreszenz	
3.9.1.3 Sekundäre Antikörper (Westernblot)	49
3.9.1.4 Sekundäre Antikörper (Immunohistochemie und Immunfluoreszenz)	
3.9.2 Verwendete Primer	49
Fraebnisse	
4.1 Aktivierung von onkogenem K-ras <sup>G12D</sup> führt zu einer Hyperproliferation von	Enterozyten
im Jejunum	
4.2 Expression von onkogenem K-ras <sup>G12D</sup> führt zur Bildung von hyperplastischer einem serratierten Phänotyp im Kolon von <i>K-ras</i> <sup>G12Dint</sup> -Mäusen	ı Polypen mit 53
4.3 Induktion der Expression von K-ras <sup>G12D</sup> im adulten Tier führt zu der Bildung	g von
4.4 Onkogene K-ras-Expression führt zur selektiven Aktivierung von Erk in Ent	erozyten des
Kolons	
4.5 Die Aktivierung der Ras-Raf-Mek-Erk-Signalkaskade in der <i>K-ras<sup>G12Dint</sup></i> -Mau einer p16 <sup>Ink4a</sup> -abhängigen OIS im Kolon	ıs führt zu 59

4.6 Onkogenes K-ras führt zur selektiven Aktivierung von Erk in Enterozyten des Jejunums, jedoch nicht zu einer OIS
4.7 Deletion von <i>Ink4a/Arf</i> in der <i>K-ras<sup>G12Dint</sup>-</i> Maus führt zu einer Hyperproliferation und Tumorprogression im Kolon
4.8 <i>K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-</i> Mäuse entwickeln invasive Karzinome im Kolon und Lungenmetastasen
4.9 Die serratierten Karzinome der <i>K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-</i> Mäuse sind CIMP-negativ und MSS/MSI-L
4.10 Aktivierung von APC/β-catenin in Verbindung mit K-ras <sup>G12D</sup> -Expression induziert Tumorgenese über den klassische Weg, nicht jedoch über die alternative Route
4.11 Serratierte <i>K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup></i> -Kolontumoren weisen einen alternativen, molekularen Fingerabdruck auf
4.12 Humane serratierte Adenome mit KRAS-Mutation zeigen eine Induktion von p16 <sup>INK4A</sup> - abhängiger OIS
4.13 Isolation von Tumorzelllinien verschiedenen Genotyps erlaubt vergleichende <i>in vitro</i> Experimente von klassichen Tumorzellen und Tumorzellen alternativer Tumoren
4.14 Anhang Ergebnisse
5. Diskussion
5.1 K-ras <sup>G12D</sup> als Initiator der serratierten Tumorgenese
5.2 Der Effekt von K-ras <sup>G12D</sup> -Expression auf die Proliferation von Enterozyten
<b>5.3 Die K-ras<sup>G12D</sup>-vermittelte Onkogen-induzierte Seneszenz</b>
5.4 Die OIS in den hyperplastischen Polypen ist abhängig von p16 <sup>Ink4a</sup> -Expression91
5.5 Die Rolle von CIMP/MSI in der Tumorprogression der K-ras <sup>G12Dint</sup> /Ink4a/Arf <sup>/-</sup> -Maus 93
5.6 K-ras <sup>G12Dint</sup> /Ink4a/Arf <sup>/-</sup> -Karzinome entwickeln sich APC-unabhängig
5.7 Mechanismen der Tumorprogression in der K-ras <sup>G12Dint</sup> -Maus
5.8 Charakterisierung der Lungenmetastasen der K-ras <sup>G12Dint</sup> /Ink4a/Arf <sup>/-</sup> -Mäuse
5.9 In vitro-Analyse von Zelllinien verschiedener Tumorentitäten
5.10 Gemeinsamkeiten und Unterschiede früherer <i>K-ras</i> -Mausmodelle und der <i>K-ras<sup>G12Dint</sup>-</i> Maus
5.11 Unterschiedliche Effekte der K-ras <sup>G12D</sup> -Expression auf das Jejunum und das Kolon 99
5.12 Die K-ras <sup>G12Dint</sup> -Maus als Modell für die serratierte Karzinogenese
6. Zusammenfassung103
7. Literatur
8. Abkürzungsverzeichnis113

# 1. Einleitung

# 1.1 Das kolorektale Karzinom

## 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2006 wurden laut einer Schätzung in Europa 3 191 600 neue Krebsfälle diagnostiziert (Ferlay et al., 2007). Darmkrebs ist neben Brustkrebs und Lungenkrebs sowohl bei Männern als auch bei Frauen unter den drei häufigsten aller Krebserkrankungen und gilt als dritthäufigster Grund von krebsassoziierten Todesfällen in Europa (Ferlay et al., 2007). Es ist zu erwarten, dass es zu einer Zunahme der Personen in der Gesamtbevölkerung weltweit geben wird, die ein Kolonkarzinom entwickeln. Im Gegensatz zu Afrika, Asien und Südamerika sind vor allem die nordeuropäischen Länder und Nordamerika von einer höheren Tumorinzidenz betroffen. Die meisten Fälle treten ab einem Alter von etwa 50 Jahren auf, das mittlere Alter erkrankter Personen beträgt 71 Jahre (gemessen in einem Zeitraum von 2002-2006, Horner MJ et al., SEER Cancer Statistics Review, NCI, 2009). Umfangreiche Studien haben neben geografischen Unterschieden weitere wichtige Faktoren identifiziert, die ein erhöhtes Krankheitsrisiko hervorrufen. Sowohl äußere Einflüsse als auch erbliche Anlagen oder chronische Kolitis können das Risiko ein Karzinom zu entwickeln erhöhten.

## 1.1.2 Aetiologie

Mit etwa 90% aller Fälle sind die durch äußere Einflüsse und spontane genetische Mutationen entstandenen Tumoren im Kolon die häufigste Ursache für ein kolorektales Karzinom. Risikofaktoren für die Entstehung sporadischer Tumoren sind vorwiegend ballaststoffarme und fettreiche Ernährung sowie Übergewicht und Rauchen (Potter, 1999).

Neben den sporadisch entstandenen Tumoren werden 5% aller Kolonkarzinome erblichen Erkrankungen zugeschrieben, die sich auf *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) und *Hereditery Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) verteilen. Menschen mit diesen Vorbelastungen haben ein 95% Risiko, im Laufe ihres Lebens ein Karzinom zu entwickeln.

Weitere 5% werden der kolitisassoziierten Kolonkarzinogenese zugeschrieben, an der Menschen mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) leiden. Durch

eine chronische Entzündung der Mukosa haben Menschen mit dieser Krankheit nach 20 Jahren ein 5,5 – 21% Risko ein Kolonkarzinom zu entwickeln (Eaden and Mayberry, 2000).

# 1.2 Entstehungsmechanismen unterschiedlich klassifizierter Kolontumoren

Karzinogenese ist ein Prozess, der durch Akkumulation multipler Schritte stattfindet und kann sowohl Mutationen in Onkogenen oder Tumorsupressorgenen, Inaktivierung von *DNA-Mismatch*-Reparatur-Enzymen als auch epigenetische Veränderungen der DNA wie Hypermethylierung beinhalten. In welcher Reihenfolge diese Schritte im Laufe der Karzinogenese stattfinden ist nicht eindeutig geklärt und die Entwicklung folgt keinem einheitlichen Muster.

Auf genetischer Ebene werden hauptsächlich zwei initiierende, bei der Tumorbildung entscheidende Ereignisse unterschieden: chromosomale Instabilität und Mikrosatelliteninstabilität.

#### 1.2.1 Tumoren mit chromosomaler Instabilität: Das Vogelsteinmodell

Die Entstehung eines klassischen Kolonkarzinoms ist Anfang der 90er Jahre mit dem von Bert Vogelstein eingeführten Modell einer Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben worden (Fearon and Vogelstein, 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996). Hierbei ist nicht nur die Art der Mutation, sondern auch die Reihenfolge der akkumulierenden genetischen Alterationen für die Karzinogenese entscheidend. Das Modell geht von einer zugrunde liegenden chromosomalen Instabilität aus.

*APC*-Inaktivierung gilt laut diesem Modell als Initiator der kolorektalen Tumorgenese, das Protein wird deshalb als der "*Gatekeeper*" der Karzinogenese bezeichnet. Mutationen von *APC* sind einerseits charakteristisch für die Entstehung klassischer, sporadischer Kolonkarzinome, andererseits für Adenome von FAP-Patienten. In Etwa 70 - 85% aller sporadisch enstandenen Adenome und Karzinome ist *APC* mutiert (De Filippo et al., 2002; Powell et al., 1992). Die Inaktivierung des Gens führt zu einer Bildung von dysplatischen *Aberrant Crypt Foci* (ACF) im Kolonepithel, der frühesten erkennbaren Form eines Tumors. In diesen Läsionen können bereits *APC*-Mutationen nachgewiesen werden (Jen et al., 1994; Smith et al., 1994), was den Beweis für eine Involvierung von *APC* in der frühen Tumorgenese liefert. Auf molekularer Ebene führt die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors β-

Catenin als Folge der APC-Inaktivierung zu gesteigerter Proliferation der Epithelzellen. Im zweiten Schritt des Vogelsteinmodells tritt eine Mutation im KRAS-Gen auf, die mit der Tumorprogression zum Adenom gekoppelt ist. Neben einer APC-Inaktivierung findet sich in etwa 40 – 60% aller Adenome und Karzinome des Kolons eine Aktivierung von onkogenem KRAS (Capella et al., 1991; McLellan et al., 1993). Es treten hauptsächlich Punktmutationen auf, die das Exon 1 des Gens und das Codon 12 oder 13 und seltener das Codon 61 betreffen (Bos, 1989). Eine Aktivierung von KRAS führt zu Wachstumsstimulation der Zellen und involviert die Aktivierung von *Downstream*-Signalwegen wie die Raf-Mek-Erk-Signalkaskade oder die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3Kinase), die entsprechend die Proliferation der Zellen steigern oder zur Inhibition von Apoptose führen. KRAS wird als Initiator der kolorektalen Karzinogenese als unwahrscheinlich erachtet, da laut einer Studie eine Aktivierung des Onkogens nur in 10% der Adenome mit weniger als 1 cm Durchmesser, jedoch in 50% der größeren Adenome gefunden wurde (Vogelstein et al., 1988) und eine Mutation somit eindeutig mit weiter entwickelten Tumoren assoziiert ist. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese kommt es zu zusätzlichen Mutationen in den Genen SMAD2/SMAD4 oder DCC. Diese Gene liegen auf dem Chromosom 18q sehr dicht beieinander, einer Stelle, die in 73% aller kolorektalen Karzinome mit einem Loss of Heterozygosity (LOH) und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Vogelstein et al., 1988). Die Progression zu einem Karzinom und zur Metastasierung beinhaltet dann eine Mutation des Tumorsupressorgens p53. Der Tumorsupressor p53 ist in 40 – 50% aller sporadischen Kolontumoren mutiert, vor allem die Exons 5 bis 8 des Gens sind hierbei betroffen (lacopetta, 2003). p53 kann unter anderem Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren und ist meist mit der Progression vom Adenom zum Karzinom und mit einer Metastasierung assoziiert (Fearon and Vogelstein, 1990). Eine Initiierung der Kolonkarzinogenese durch eine Mutation von p53 wird ausgeschlossen, da Patienten mit defektem p53 ohne zusätzliche Mutationen keine Adenome oder Karzinome im Kolon entwickeln (Garber et al., 1991).

Das Vogelsteinmodell kann anhand der Mutationsreihenfolge der genannten Gene, die jeweils mit einem bestimmten Stadium der Tumorprogession assoziiert sind, dargestellt werden (Abb. E1).



**Abb. E1**| **Die klassische Kolonkarzinogenese.** Nach dem Vogelsteinmodell kommt es durch chromosomale Instabilität zur stufenweisen Akkumulation genetischer Alterationen. Inaktivierung von *APC* führt zur Bildung von ACF, gefolgt von einer Mutation von *KRAS* und der Progression zum Adenom. Durch Mutationen von Genen auf dem Chromosom 18q (*DCC*, *SMAD2/4*) kommt es zur Entstehung eines Karzinoms. Eine Mutation des Tumorsupressors *p53* führt schließlich zur Metastasierung.

#### 1.2.2 Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität

Der zweite Signalweg zur Krebsentstehung ist durch eine Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet, die mit einer Inaktivierung von *DNA-Mismatch*-Reparatur-Enzymen (MMR) assoziiert ist. Diese Form der Karzinogenese trifft auf Tumoren der an HNPCC leidenden Patienten zu. Durch die Inaktivierung von MMR kommt es zu einer fehlerhaften Replikation der in der DNA vorhandenen Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind einfache *DNA-Repeat*-Sequenzen einer definierten Länge, die im gesamten Genom auftreten. Sind diese Bereiche von einer Insertion oder Deletion von Basen betroffen, so kommt es zu einer *Frameshift*-Mutation des betroffenen Gens. Man spricht dann von einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Die Folge einer MSI ist die Inaktivierung weiterer MMR Gene, häufig *MGMT*, *MLH-1 hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2* und *hMLH-6*. Aufgrund des defekten Reparatur-Mechanismus kommt es daraufhin zu einer Akkumulation von Mutationen weiterer Gene und zur Entstehung eines Adenoms.

Bei der Analyse von Tumoren wird je nach Grad der MSI unterschieden. Dabei liegen der Analyse 5 ausgewählte Marker zugrunde. MSI-H *(High Frequency MSI)*-Tumoren zeigen bei 2 oder mehr der Marker eine Instabilität, MSI-L *(Low Frequency MSI)*-Tumoren zeigen bei einem der Marker eine Instabilität und MSS *(Microsatellite stable)* bedeutet, dass in keinem der Marker Anzeichen einer MSI vorliegen (Boland et al., 1998). MSI-H-Tumoren enstehen vor allem im proximalen Kolon und sind oft von einer Inaktivierung von *hMLH-1* begleitet (Cunningham et al., 1998). Eine *KRAS*-und *p53*-Mutation tritt hingegen häufiger bei MSI-L- oder MSS-Tumoren auf. Außerdem ist in über 90% der mit MSI assoziierten Fälle eine Mutation im *TGFβRII*-

Gen festgestellt worden, die meist mit einer MSI-H korreliert, aber auch in MSS-Tumoren auftreten kann (Grady et al., 1999). Mutationen, die den Wnt-Signalweg betreffen, spielen in der Karzinogenese dieses Konzepts eine unbedeutende Rolle.



Modifiziert nach O'Brien MJ, 2007

Abb. E2| Prozentuale Verteilung sporadischer Kolonkarzinome mit Schlüsselmutationen von *BRAF, KRAS* oder *APC* anhand genetischer Charakteristika. CIMP: *CpG Island Methylator Phenotype* (neg: Negativ; L:Low; H:High); MSI: Mikrosatelliteninstabilität (L: *Low*; H: *High*); MSS: Mikrosatellitenstabil.

# 1.3 Alternative Signalwege zur Krebsentstehung

Neben den Tumoren, die aufgrund von chromosomaler Instabilität oder Mikrosatelliteninstabilität entstehen, gibt es eine dritte Klasse von Tumoren. Diese Tumoren entstehen unabhängig von einer *APC*-Mutation, können jedoch teilweise eine Assoziation mit einer Inaktivierung von MMR-Genen aufweisen. Eine detaillierte molekulare Charakterisierung dieser Tumoren weicht von den oben beschriebenen ab und trifft auf Tumoren zu, die über den *TGF* $\beta$ /*SMAD*-*Signalweg* oder die serratierte Route entstehen.

## 1.3.1 Der TGF<sup>β</sup>/SMAD-Signalweg

Tumorgenese entlang des  $TGF\beta/SMAD$ -Signalweges beinhaltet eine Entstehung von Karzinomen vornehmlich im proximalen Kolon und im Zökum. Sie unterscheiden sich histologisch von den klassichen Kolontumoren und weisen oft einen mukusreichen Phänotyp und Metastasierung auf (Boivin et al., 2003). *TGF* $\beta$ *RII*-Mutationen spielen

in der Transformation von Adenomen zu Karzinomen auch in der klassischen Karzinogenese eine Rolle (Grady and Markowitz, 2002; Munoz et al., 2006).

#### 1.3.2 Der serratierte Signalweg

Der serratierte Weg der Kolonkarzinogenese beschreibt eine Entstehung von sporadischen Adenomen, den serratierten Adenomen. Schätzungsweise 7,5 bis 15% aller sporadisch entstandenen Tumoren haben ihren Ursprung in serratierten Polypen (Makinen, 2007) (vgl. Abb. E2).

Entlang dieser alternativen Route kommt es initial zur Bildung von hyperplastischen Polypen, der frühesten erkennbaren Form einer Hyperplasie im Kolonepithel (Abb. E3). Bei der Entstehung dieser Läsionen geht man von einer Assoziation mit MSI, nicht von einer chromosomalen Instabilität aus. Diese Polypen unterscheiden sich jedoch von den in HNPCC-Patienten vorkommenden Tumoren, weil eine Deffizienz in der Mismatch-Reparatur-Maschinerie nicht als initialer Schritt vermutet wird. Bei der Entstehung von Tumoren entlang des serratierten Weges sind einerseits genetische Alterationen wie eine MSI, andererseits epigenetische Faktoren wie Methylierung von Bedeutung (Kambara et al., 2004). Die Methylierung von CpG Islands in der DNA führt zum Silencing der betroffenen Gene. CpG Islands sind DNA-Sequenzen in der Promoterregion eines Gens, die eine hohe Frequenz von CG Repeats aufweisen. Kommt es in diesen DNA-Regionen zu einer Methylierung durch den Transfer von Methylgruppen an Zytosin, kann dies zur Inaktivierung des Gens führen. Bei Tumoren mit einem Methylierungsmuster in der DNA spricht man von einem CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). Es wird zwischen Tumoren mit CIMP-H (CpG Island Methylator Phenotype high), CIMP-L (CpG Island Methylator Phenotype low) oder CIMP-negativ unterschieden. Die Inaktivierung von DNA-Mismatch-Reparatur-Enzymen, die zu einer MSI führen können, ist in diesen Tumoren oft durch Methylierung der Promoterregionen der entprechenden Gene zu erklären.

Häufig weisen Tumoren, die entlang des serratierten Signalweges entstanden sind, eine *BRAF* (V600E)- oder *KRAS* (G12D)-Mutation auf. Lange Zeit schätzte man diese Polypen als ungefährlich ein, da man eine Progression zu kolorektalen Karzinomen ausschließlich entlang der von Vogelstein vorgeschlagenen Adenom-Karzinom-Sequenz oder in Assoziation mit HNPCC vermutete.



**Abb. E3**| **Alternative, serratierte Kolonkarzinogenese.** In der Mukosa bilden sich hyperplastische Polypen, die *KRAS*- oder *BRAF*-Mutationen aufweisen, aber von *APC* Inaktivierung unabhängig sind. Die Progression zum serratierten Adenom und zum Karzinom kann von MSI-H, MSI-L oder MSS begleitet oder durch den *CpG Island Methylator Phenotype* gekennzeichnet sein.

Weitere Analysen zeigten aber, dass entlang des serratierten Signalweges ebenfalls Karzinome entstehen können, die sich sowohl auf molekularer Ebene als auch histologisch von den bisher beschriebenen Tumormodellen abgrenzen (Goldstein et al., 2003; Jass, 1999; Jass, 2001).

In detaillierten, histologischen und molekularen Klassifikationen kann man serratierte Tumoren aufteilen in hyperplastische Polypen (HP), traditionelle serratierte Adenome (TSA), sessile serratierte Adenome (SSA) und *Mixed Polyps* (MP) (Makinen, 2007; Noffsinger, 2009; Torlakovic et al., 2003). Das terminale Stadium der serratierten Route ist das serratierte Kolonkarzinom. Bei allen Formen ist eine Mutation von *APC* oder *p53* höchst selten, vielmehr spielen die Akkumulation der bereits erwähnten Faktoren - Aktivierung von onkogenem BRAF oder KRAS, DNA-Methylierung und MSI - eine entscheidende Rolle. Die verschiedenen Tumoren können aufgrund von histologischen Charakteristika voneinander unterschieden werden, obwohl es häufig Überlagerungen von bestimmten Charkteristika der einzelnen Subtypen gibt (Jass et al., 2006).

#### 1.3.2.1 Hyperplastische Polypen (HP)

Hyperplastische Polypen werden in den meisten Fällen als harmlos eingestuft. Sie sind vor allem im linksseitigen Kolon lokalisiert und werden bei etwa 10-12% aller koloskopierten Fälle diagnostiziert (Imperiale et al., 2002). Ihre Architektur ist noch als organisiert zu erkennen und die Symmetrie der Krypten-Villus-Achse ist noch vorhanden (Abb E5 A). Diese Polypen unterscheiden sich von der normalen Mukosa durch eine Verlängerung der Krypten, die sowohl apikale, serratierte (sägeblattartige)

Einleitung

Strukturen als auch eine basale Expansion der proliferativen Zone aufweisen. Man vermutet bisher, dass der serratierte Phänotyp auf eine Inhibition von Apoptose zurückzuführen ist, wodurch es zu einer erhöhten Dichte von Epithelzellen kommt, die zu der serratierten Struktur im Epithel führt (Tateyama et al., 2002). Häufig zeichnen sich hyperplastische Polypen durch Anomalien in der Population von Becherzellen aus, die sowohl verringert als auch erhöht sein kann und mit einer erhöhten Sekretierung von Mukus einhergeht. Hyperplastische Polypen werden als die Vorläufer der serratierten Adenome bezeichnet. Die Polypen weisen mit hoher Frequenz eine *BRAF*- oder eine *KRAS*-Mutation auf (Wynter et al., 2004).

#### 1.3.2.2 Traditionelle serratierte Adenome (TSA)

Die Entstehung eines traditionellen serratierten Adenoms ist prädominant mit dem linksseitigen Kolon assoziiert, sie können jedoch auch im proximalen Kolon auftreten. Auf histologischer Ebene werden diese Adenome durch eine uniforme Zellpopulation aus langen, eosinophilen Zellen mit hyperchromatischen Nuklei charakterisiert (Noffsinger, 2009). In diesen Adenomen kann man Kryptenanomalien und eine erhöhte Dysplasie erkennen (Abb. E5 C). TSA sind eher mit einer *KRAS*-Mutation als einer *BRAF*-Mutation assoziiert. Diese Tumoren sind meist MSI-L oder MSS und zeigen eine Assoziation mit CIMP-negativ oder CIMP-L (Abb. E4). TSA können gelegentlich eine erhöhte und unregelmäßige Proliferation zeigen, die mit Adenomen der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz zu vergleichen ist. Daher wird bei manchen TSA im linksseitigen Kolon eine molekulare Verbindung mit klassischen Adenomen vermutet.

#### 1.3.2.3 Sessile serratierte Adenome (SSA)

Anders als die TSA sind sessile serratierte Adenome vornehmlich im rechtsseitigen Kolon lokalisiert. Ähnlich wie HP weisen diese Adenome häufig eine Anomalie in der Population der Becherzellen auf oder zeigen eine starke Expression von Mukus, erscheinen jedoch deutlich größer als die HP. Charakteristisch ist eine unorganisierte Architektur, die sowohl eine Verlägerung und Verzweigung der Krypten als auch Lund T-geformte Krypten beinhaltet (Abb. E5 A). Die Serration reicht bis tief in die Krypten und die Proliferation im Adenom ist deutlich erhöht. Außerdem wird für diese Tumoren ein höheres malignes Potenzial vermutet. Eine Mutation in *BRAF* ist in diesen Tumoren häufiger als eine *KRAS*-Mutation. Dies geht in den meisten Fällen mit MSI-H und CIMP-H einher und führt zum Verlust von MLH-1 (Goldstein et al., 2003) (Abb. E4).



hyperplastische Polypen, die entweder in einen Wachstumsarrest eintreten, oder aus denen TSA, SSA oder MP und später serratierte Karzinome entstehen. Die Route über *KRAS*-Mutation führt vor allem zur Bildung von TSA, die CIMP-neg oder CIMP-L und MSS oder MSI-L sind. Die agressivere Route über BRAF führt vor allem zur Bildung von SSA, die CIMP-H und MSI-H sind. Abkürzungen: ACF: *Abberrant Crypt Focus*; HPP: Hyperplastischer Polyp; MP: *Mixep Polyp*; TSA: Traditionelles serratiertes Adenom; SSA: Sessiles serratiertes Adenom.

## 1.3.2.4 Mixed Polyp (MP)

Häufig können serratierte Adenome durch ihr histologisches Erscheinungsbild nicht eindeutig zugeordnet werden, da sie zusätzlich Charakteristika eines klassischen Adenoms zeigen. Zu den *Mixed Polyps* gehören beispielsweise große HP mit Dysplasie oder Adenome, die neben einer geringen bis hochgradigen Dysplasie serratierte Bereiche zeigen. MP entstehen fast ausschließlich im linksseitigen Kolon (Oh et al., 2005).

## 1.3.2.5 Serratiertes Adenokarzinom

Etwa 7,5% aller Kolonkarzinome können den serratierten Adenokazinomen zugeordnet werden (Makinen, 2007). Histologische Charakteristika dieser Tumoren können serratiertes Epithel, geringe bis mäßige Differenzierung und eine hohe Produktion von Mukus sein (Abb. E5 D). Die Lokalisation und die molekularen Eigenschaften eines solchen Karzinoms leiten sich von dem Adenomtyp ab, aus dem es entsteht. Das Karzinom kann demnach aus MP, TSA oder SSA hervorgehen.

Karzinome, die aus einem TSA hervorgehen und mit einer initialen *KRAS*-Mutation assoziiert sind, sind MSS oder MSI-L und vor allem linksseitig lokalisiert. Karzinome, die entlang des SSA-Weges entstanden sind weisen hingegen eine MSI-H auf, sind meist mit einer *BRAF*- oder *KRAS*-Mutation assoziiert und rechtseitig lokalisiert (Abb. E4; Abb. E2).



Abb. Histologie E5 verschiedener Typen serratierten von Tumoren. (A) Hyperplastischer Polyp mit serratierten Krypten. (B) Sessiles serratiertes Adenom mit Kryptenanomalien und Branching. (C) Traditionelles serratiertes Adenom mit sternförmig verzweigten Krypten und langen, eosinophilen Zellen. (D) Übersicht eines serratierten Karzinoms aus dem proximalen Kolon. Bilder (A, B, C) aus Noffsinger EA, 2009 und (D) aus Kirchner T, 2008.

# 1.4 Signalkaskaden in der Karzinogenese

## 1.4.1 Der Wnt-Signalweg: Initiator der klassischen kolorektalen Karzinogenese

Das Gen APC liegt auf Chromosom 5q und gilt als Hauptfaktor der Initiation der klassischen Karzinogenese im Kolon. APC ist zusammen mit Axin und der Glykogen-Synthase-Kinase3 (Gsk3) Bestandteil eines intrazellulären Komplexes. Bei einem nicht aktivierten Signalweg sorgt dieser Komplex durch Gsk3 zur phosphorylierungsabhängigen, Ubigutin-vermittelten Degradation des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin (Abb. E6 A). Wird durch Bindung des extrazellulären Liganden Wnt an den Rezeptor Frizzled das Protein Disheveled aktiviert, so wird die Aktivität des APC-Axin-GSK3-Komplexes gehemmt (Abb. E6 B). Infolgedessen kommt es aufgrund der fehlenden Degradation zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin,

welches in den Nukleus transloziert und als Komplex mit TCF4 die Transkription von proliferationsfördernden Zielgenen wie *c-Myc* und *CyclinD1* startet.

In der Tumorgenese führt eine Mutationen von *APC* zu einem frühzeitigen Translationsstop und zu einem verkürzt exprimierten Protein. Die Folge ist eine Aktivierung des Wnt-Signalweges *downstream* von APC. Durch die Mutation verliert APC seine Funktion in dem APC-Axin-GSK3-Komplex und  $\beta$ -Catenin kann nicht länger abgebaut werden (Abb. E6 C). In diesem Fall transloziert membranständiges  $\beta$ -Catenin ebenfalls in den Nukleus und initiiert die Transkription.



Abb. E6| Der Wnt-Signalweg. (A) Bei inaktivem Signalweg wird  $\beta$ -Catenin durch den aktiven Komplex aus APC, Axin und Gsk3 phosphoryliert und abbgebaut. (B) Durch die Bindung von Wnt an den Rezeptor Frizzled wird Disheveled aktiviert und hemmt den Komplex.  $\beta$ -Catenin akkumuliert und wandert in den Nukleus, um die Transkription zu starten. (C) Bei einem mutierten APC-Protein ist der Komplex ebenfalls gehemmt und  $\beta$ -Catenin kann im Nukleus die Transkription initiieren.

#### 1.4.2 Die Ras-Signalkaskade in der Karzinogenese

Ras-Proteine sind involviert in eine Vielzahl von zellulären Prozessen, indem sie extrazelluläre Signale durch spezifische Signalweiterleitung innerhalb der Zelle vermitteln. Funktionen wie Proliferation und Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Überleben gehören zu den Wichtigsten.

Es gibt drei *RAS*-Gene, die für die Kodierung von vier verschiedenen Ras-Proteinen verantwortlich sind: N-Ras, H-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B. Bei den Ras-Isoformen

sind die N-terminalen 165 Aminosäuren über 95% identisch. Diese Region bedingt bei entsprechender Aktivierung eine Konformationsänderung des Proteins. Unterschiede in der Struktur der Ras-Isoformen kommen zwischen den Aminosäruren 166 und 185 vor. Hier befindet sich die Hypervariable Region. Am C-Terminus des Proteins befindet sich ein konserviertes CAAX-Motiv [Cystein (C), gefolgt von einer alphatischen Aminosäure (AA) sowie Methionin oder Serin (X)], welches unter anderem über Farnesylierung die posttranslationalen Modifikationen der Isoformen steuert. Dadurch wird auch die genaue Lokalisation und Bindung von Ras an die Plasmamembran bestimmt (Apolloni et al., 2000; Omerovic et al., 2007). Die Folge der unterschiedlichen Membranaffinitäten und Verankerungen der Isoformen ist eine variable Exposition der für die Signalweiterleitung wichtigen Motive und eine unterschiedliche Interaktion mit Membran-Nanoklustern (Omerovic et al., 2008; Prior et al., 2003; Shaw and Cantley, 2006). Dadurch kommt es zu Differenzen in der Interaktion von Ras mit Upstream- und Downstream-Effektoren, wodurch die Aktivierung verschiedener Signalwege ermöglicht wird (Yan et al., 1998).

Ras-Proteine gehören zu der Familie der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine. Diese sind membranständige GTPasen mit enzymatischer Aktivität, die entweder in einer aktiven, GTP-bindenden oder einer inaktiven, GDP-bindenden Form vorliegen. Die Bindung an GTP wird von Upstream-Effektoren vermittelt, den Guanine Exchange Factors (GEFs) (Downward, 1990) und führt zu einer Konformationsänderung der Tertiärstruktur und damit zu einer Aktivierung des Proteins. Im Gegensatz dazu sorgen die GTPase Activating Proteins (GAPs) für eine Hydrolyse von Ras-gebundenem GTP zu GDP und sind deshalb für die Inaktivierung von aktivem Ras verantwortlich. GEFs und GAPs sind für die Regulation und das intrazelluläre Gleichgewicht von aktivem und inaktivem Ras zuständig.

Die Aktivierung von Ras kann eine Reihe verschiedener Signalwege in Gang setzen. Eine Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) durch Wachstumsfaktoren oder Integrinen führt zu einer Aktivierung des Adapterproteins Grb2, was wiederum den durch die GEFs Sos1 oder Sos2 vermittelten Austausch von inaktivem Ras-GDP zu aktivem Ras-GTP ermöglicht (Abb. E7). Liegt aktives, GTP-gebundenes Ras vor, so können Signalwege aktiviert werden, die vor allem Auswirkungen auf Transkription, Proliferation, Überleben, Inhibition von Apoptose und Differenzierung haben. Als erste Effektoren des Ras-Signalweges wurden Anfang der 90er Jahre Raf-1 (Moodie et al., 1993) und Pi3Kinase (Rodriguez-Viciana et al., 1994)

beschrieben. Durch GTP-Ras aktiviertes Raf-1 bewirkt eine Aktivierung der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK)-Kaskade über Mek und Erk und führt zur Regulation von Transkriptionsfaktoren verschiedener Zielgene. Die Folge ist hauptsächlich eine Steigerung der Proliferation. Hyperaktives Ras und die Involvierung der Raf-Mek-Erk-Kaskade spielt zudem eine Rolle in verschiedenen Entwicklungsdefekten, was eine Funktion des Signalweges bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen bestätigt (Schubbert et al., 2007; Shannon and Bollag, 2007). Die Ras-Raf-Mek-Erk-Signalaktivität gilt über dies auch als einer der Hauptfaktoren von Onkogen-induzierter Seneszenz (Mooi and Peeper, 2006) und hat somit Einfluss auf den Zellzyklus und das Tumorwachstum.



**Abb. E7**| **Der Ras Signalweg.** Aktivierung von RTKs vermittelt die Bindung von GTP an Ras und aktiviert verschiedene Signalkaskaden mit einer Vielzahl von Funktionen. Die Aktivierung von Raf führt zur Stimulation von Proliferation und Transkription über die MAP Kinase Kaskade, Die Aktivierung von Pi3Kinase bedingt eine Inhibition von Apoptose. Daneben kann durch die Aktivierung der Raf-Mek-Erk Kaskade durch die Regulation von Zellzyklusinhibitoren Seneszenz induziert werden.

Eine Aktivierung der Pi3Kinase bewirkt unter anderem eine Phosphorylierung von Akt und hat einen antiapoptotischen Effekt auf die Zelle. Aktives Akt kann proapoptotische Proteine hemmen und so zum Überleben der Zelle beitragen (Vivanco and Sawyers, 2002). Diese beiden Signalwege sind die am besten untersuchten, daneben sind heute eine Reihe weiterer Ras-Effektoren bekannt, darunter Rac/Rho, RalGDS, MEKK, AF6, PLCε und Rassf1 (Abb. E7). Durch sie werden Funktionen wie Zellmotalität, *Second Messenger*-Signale, Zell-Zell-Interaktionen, Apoptose und Vesikeltransport gesteuert (Malumbres and Barbacid, 2003).

Ras spielt in der Tumorbiologie eine wichtige Rolle, da durch die Signalübertragung zwei entscheidende Faktoren zum Tumorwachstum beitragen können: die unkontrolliert ablaufende Proliferation von Zellen durch eine konstitutive Aktivierung von Ras sowie ein gehemmtes Absterben der funktionsgestörten Zellen durch Inhibition von Apoptose. Zudem werden in zahlreichen Tumoren Mutationen von *KRAS* oder *BRAF* gefunden, was eine besondere Relevanz der Ras-Raf-Mek-Erk-Kaskade in der Tumorbiologie unterstreicht.

#### 1.5 Onkogenes K-ras

Ras-Onkogene sind die im Tumor am häufigsten mutierten Gene und kommen etwa in 30% aller Krebsarten vor. Sie sind besonders im Pankreas, in der Lunge, bei Leukämie und im Kolon von Bedeutung (Schubbert et al., 2007). Welches der Ras-Proteine mutiert ist, hängt von der Lokalisation des Tumors ab. *NRAS*-Mutationen treten vor allem bei Leukämie auf, wohingegen *HRAS* bei der Tumorgenese in der Blase und der Niere eine wichtige Rolle spielt. *KRAS*-Mutationen treten in 20% aller Lungentumore, 60% der Pankreastumore und in 30-50% der Kolontumore auf (Bos, 1989; Schubbert et al., 2007).

Unter allen onkogenen Ras-Formen ist K-Ras das am häufigsten mutierte, und *in vitro* Studien haben belegt, dass unter allen Isoformen onkogenes K-Ras das größte Potenzial zur Transformation verschiedener Zelllinien hat (Keller et al., 2007). Zusätzlich ist K-Ras die einzige der Ras-Isoformen, die auch in der Entwicklung eine Rolle spielt (Esteban et al., 2001; Plowman et al., 2003; Voice et al., 1999). K-Ras kommt in zwei *Splicing*-Varianten vor, K-Ras4a und K-Ras4b, die sich in Exon 4 des Gens unterscheiden und verschiedene Funktionen bei Signalaktivierung und in der Embryonalentwicklung haben. Während K-ras4a für die embryonale Entwicklung in der Maus nicht essentiell ist, ist eine Deletion der Funktion von K-ras4b im Mausembryo letal (Johnson et al., 1997).

Für die Tumorgenese sind aktivierende Punktmutationen von Bedeutung. Diese treten hauptsächlich in den Codons 12, 13 und 61 auf (Bos, 1989; Capella et al.,

Einleitung

1991). Dabei ist eine Mutation im Codon 12 in Exon 1 vorherrschend, die zur Translation von Aspartat anstatt Glycin (G12D) oder zu Valin anstatt Glycin (G12V) führt. Diese Punktmutationen betreffen eine Base nahe der Bindungsdomaine für GAPs und bedingen eine Konformationsänderung des Proteins, die wiederum eine Hydrolyse von Ras-gebundenem GTP zu GDP hemmt. Dies führt zwangsläufig zu einer Arretierung von Ras in der GTP-gebundenen Form und damit zu einer konstitutiven Aktivierung der *Downstream*-Signalwege (Scheffzek et al., 1997). Die Transkription von Zielgenen, die beispielsweise verantwortlich sind für Proliferation oder Inhibition von Apoptose, kann nun unkontrolliert ablaufen.

#### 1.5.1 Die Rolle von K-ras in der Karzinogenese

Das Onkogen *KRAS* ist aufgrund der häufigen Involvierung in der Karzinogenese seit vielen Jahren das Ziel intensiver Forschung sowohl in *in vitro* Experimenten als auch *in vivo* unter Verwendung von Mausmodellen. Es ist das Ziel, eine mit dem humanen Krankheitsbild besser vergleichbare Plattform zu schaffen, die es ermöglicht, detaillierte Mechanismen in einer Vielzahl von Tumortypen und unter verschiedenen Bedingungen zu entschlüsseln.

Ein Mausmodell für die Aktivierung von onkogenem K-ras durch eine spontane Rekombination im gesamten Tier zeigte vor allem eine Bildung von Lungenadenomen und Karzinomen (Johnson et al., 2001). Die dadurch begründete frühe Letalität der Tiere limitierte eine Beobachtung des Effektes der K-ras-Expression auf andere Organe zu einem späteren Zeitpunkt. Durch die Einführung eines Mausmodells mit endogener Expression von K-ras<sup>G12D</sup> spezifisch im Lungenepithel, die durch eine Cre-induzierte Exzision einer dem Gen vorausgeschalteten Stop-Kassette erreicht wurde (*LSL-K-ras<sup>G12D</sup>*), wurde ein mit dem humanen Krankheitsbild besser vergleichbares Modell geschaffen (Jackson et al., 2001) und erlaubte eine Beobachtung und Untersuchung der Tiere über einen längeren Zeitraum.

In einem ähnlichen Ansatz unter Verwendung des endogenen *K-ras*-Konstruktes, allerdings mit pankreasspezifischer Expression von K-ras<sup>G12D</sup>, konnte eine initiierende Rolle von K-ras bei der Bildung von PanINs *(Pancreatic Intraepithelial Neoplasia)* bis hin zur Bildung von invasiven Karzinomen im Pankreas bestätigt werden (Hingorani et al., 2003). Molekulare Mechanismen der Aktivierung von endogenem, onkogenem K-ras mit dem *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>*-Modell wurden später *in vitro* 

untersucht. Hier fand sich eine durch K-ras vermittelte Stimulierung der Proliferation und eine Aktivierung des Zellzyklus in MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*). Gezielte Expression von K-ras<sup>G12D</sup> in epithelialen Geweben in der Maus ergab hier eine durch das Onkogen hervorgerufene Hyperproliferation im Lungenepithel sowie eine durch Hyperproliferation begleitete Hyperplasie im Kolonepithel (Tuveson et al., 2004).

Die Untersuchung der Funktion von onkogenem K-ras in der intestinalen Karzinogenese wurde in einem transgenen Mausmodell mit Aktivierung von Kras<sup>G12V</sup> spezifisch im Darmepithel bestimmt. Die Expression des Onkogens wurde durch Kombination mit einem Villin-Promoter erreicht und zeigte in 80% der Fälle bereits ab einem Alter von zwei Monaten in den Mäusen sowohl eine Bildung von mehren Abberant Crypt Foci (ACF) und Adenomen als auch von Karzinomen, die vor allem im Dünndarm lokalisiert waren (Janssen et al., 2002). Die Expression von onkogenem K-ras führte zu einem erhöhten Proliferationsindex der Epithelzellen, die von einer spezifischen Aktivierung des Raf-Mek-Erk-Signalweges begleitet war. In einer weiteren Arbeit zeigte dagegen die Aktivierung von onkogenem K-ras<sup>V12</sup> durch eine von transgenem AhCre vermittelte Exzision der vorausgeschalteten Stop-Kassette keinen Effekt auf die intestinale Homöostase oder die Aktivierung des Raf-Mek-Erk-Signaweges (Sansom et al., 2006). Erst eine Aktivierung des Onkogens nach Verlust von APC führte zu einer hohen Tumorinzidenz und zur Bildung von invasiven Karzinomen im Dünndarm. In einer ähnlichen Studie wurde für ein Mausmodell mit Kombination von APC-Deletion und K-ras<sup>G12V</sup>-Expression ebenfalls eine beschleunigte Tumorgenese beschrieben. Die K-ras-Aktivierung in APC+/1638N-Mäusen führte zu einer verstärkten Wnt-Signalaktivität über den Transkriptionsfaktor β-Catenin und zu einer erhöhten Tumorinzidenz (Janssen et al., 2006). Wie kürzlich gezeigt werden konnte führte Villin-Cre-verlittelte Expression von K-ras<sup>G12D</sup> in Enterozyten im Kolonepithel von Mäusen zu einer Raf-Mek-Erk-vermittelten Hyperproliferation und einer Hyperplasie, jedoch nicht zu einer Bildung von Adenomen (Haigis et al., 2008; Trobridge et al., 2009). Erst durch Kombination des LSL-K-ras<sup>G12D</sup>-Modells mit der Deletion von Tgf*β*RII konnte die Bildung von einigen Adenomen im Dünndarm und invasiven Karzinomen im proximalen Kolon induziert werden (Trobridge et al., 2009). In diesen Tumoren waren eine gesteigerte Expression von CyclinD1 und Cdk4 sowie eine supprimierte Expression von p15<sup>Ink4b</sup> mit gesteigerter Proliferation assoziiert. Die Kombination von K-ras<sup>G12D</sup>-Expression

zur

mit einer APC-Mutation führte ebenfalls zur Bildung von Adenomen im Kolon (Haigis et al., 2008). In diesen Tumoren war ausserdem eine geringe Differenzierung mit der Expression des Onkogens assoziiert.

Anhand der verschiedenen Mausmodelle, bei denen onkogenes K-ras in unterschiedlichen Geweben und Zusammenhängen exprimiert wurde, wird deutlich, dass eine K-ras-abhängige Tumorentstehung und -progression stark vom Organ, vom zellulären Kontext und der Expressionseffizienz in den Geweben beeinflusst wird.

- Mutation G12D loxP loxP STOP E3 E1 E2 E4 Villin-Cre LSL- KrasG12D Abb. E8| Endogene Expression von K-ras<sup>G12D</sup> Villin-Cre Expression STOP der Maus. Durch in Kreuzung von Villin-Cre-Mäusen mit LSL-K-ras G12D-Mäusen erhält man Villin-Cre- K-ras<sup>G12D</sup>-Mäuse. Villin Cre- Kras<sup>G12D</sup> Durch Expression von Cre in Enterozyten unter Kontrolle Mutation des Villinpromoters kommt es G1/2D loxP diesen Mäusen in Exzision der von LoxP-E1 E2 E3 E4 sites flankierten Stop-Transkription Kassette und das Kras<sup>G12D</sup> Onkogen kann transkribiert werden.
- 1.5.2 Die LSL-K-ras<sup>G12D</sup>-Maus

Bei der LSL-K-ras<sup>G12D</sup> (Lox-Stop-Lox-K-ras<sup>G12D</sup>)-Maus (Jackson et al., 2001) weist das K-ras-Gen eine Punktmutation in Codon 12 des Exon 1 auf, bei der es zur Translation von Aspartat (D) anstatt Glycin (G) kommt (G12D). Dies führt durch eine Konformationsänderung von K-ras zur Hemmung der Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und resultiert in der konstitutiven Aktivierung des Proteins. Dem Gen ist eine von zwei LoxP-sites flankierte Stop-Kassette vorausgeschaltet, die die Expression von K-ras verhindert (Abb. E8). Durch Kreuzung dieser Maus mit der Villin-Cre-Maus (Madison et al., 2002), wird eine epithelzellspezifische Expression

der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Villin*-Promoters erreicht. Die Rekombinase vermittelt die Exzision der von den *LoxP-sites* flankierten Stop-Kassette und führt zu der *Villin*-abhängigen Transkription von *K-ras*<sup>G12D</sup> in Enterozyten. Die einheitliche Expression von Villin in Epithelzellen führt zu einer homogenen Expression von onkogenem K-ras entlang der Krypten-Villus-Achse sowohl im Dünndarm als auch im Kolon der Mäuse.

# 2. Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der hohen und zunehmenden Inzidenz von Kolonkarzinomen in der Bevölkerung ist es notwendig, Verbesserungen in der Therapie, der Früherkennung und dem Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Tumorentstehung zu erlangen. Mit genetischen Mausmodellen ist es möglich, die molekularen Grundlagen der humanen Karzinogenese zu rekapitulieren.

Bei der Verwendung von Mausmodellen für die intestinale Tumorgenese wird vor allem die für die humane Karzinogenese wichtige Aktivierung des Wnt-Signalweges berücksichtigt. Eine *APC*-Inaktivierung in Mäusen (*Apc<sup>min</sup>*, *Apc<sup>4716</sup>*, *Apc<sup>138N</sup>*) stellt aufgrund der Relevanz von *APC* in der humanen kolorektalen Karzinogenese zwar ein genetisch vergleichbares Modell dar, die Bildung von Adenomen beschränkt sich hier jedoch in der Regel auf den Dünndarm (Taketo, 2006). Darüber hinaus wird durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges in diesen Modellen ausschließlich die klassische Tumorgenese initiiert. Das Konzept einer serratierten Route der Karzinogenese, die zur Entwicklung von malignen Tumoren entlang eines alternativen Weges führt, ist in den letzten Jahren gefestigt worden, ein genetisches Mausmodell hierfür fehlt jedoch.

Die Aktivierung von onkogenem *KRAS* ist von zentraler Bedeutung in kolorektalen Tumoren und ein Schlüsselfaktor in der serratierten Karzinogenese. Anhand des von Vogelstein beschriebenen Modells der klassischen Karzinogenese durch eine initiale *APC*-Inaktivierung, wird *KRAS* als Initiator der Tumorgenese für unwahrscheinlich erachtet. Eine Mutation in diesem Gen ist nur in höher entwickelten Tumoren zu finden. Mäuse mit transgener K-ras-Expression entwickeln intestinale Adenome des klassischen Typs, die Rolle von endogen-exprimiertem K-ras<sup>G12D</sup> als Initiator in der serratierten Karzinogenese ist jedoch nicht geklärt. In dieser Arbeit soll der Effekt von aktiviertem K-ras<sup>G12D</sup> auf die Homöostase von Enterozyten sowie die Rolle des Onkogens in der Initiation der serratierten kolorektalen Karzinogenese bestimmt werden.

# 3. Material und Methoden

# 3.1 Mäuse

# 3.1.1 LSL-K-ras<sup>G12D</sup> und K-ras<sup>G12Dint</sup>

Das *Lox-Stop-Lox-K-ras* Konstrukt wurde bereits in Jackson et al. 2001 und Tuveson et al. 2004 beschrieben. Endogene *K-ras*<sup>G12D</sup>-Expression wurde hier durch eine Kreuzung mit der *Villin-Cre*-Maus erreicht. Durch die vom *Villin*-Promoter abhängige Expression von Cre in intestinalen Epithelzellen kommt es zur Exzision der mit LoxP-sites flankierten Stopkassette im Promoter des *K-ras* Gens von *Villin-Cre-LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>-Mäusen und damit zur Aktivierung des Onkogens. Diese Mäuse wurden hier *K-ras*<sup>G12Dint</sup> genannt. Entsprechende Kontrollmäuse mit vorhandener Stopkassette, bei denen das Onkogen nicht aktiviert ist, wurden *LSL-K-ras*<sup>G12D</sup> genannt.

# 3.1.2 K-ras<sup>G12Dint</sup>/Tp53<sup>-/-</sup>

Eine Kombination von aktiviertem *K-ras*<sup>G12D</sup> und einer Deletion des Tumorsupressors *Tp53* wurde durch Kreuzung der *Villin-Cre-LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>-Maus mit *Tp53*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Jonkers et al., 2001) erreicht. Bei der *Tp53*<sup>-/-</sup> Maus sind die Exons 2 bis 10 beider Allele von *LoxP-sites* flankiert, was bei Cre-Expression zur Exzision dieser Exons führt. Die aus dieser Paarung erhaltenen Mäuse wurden *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Tp53*<sup>-/-</sup> genannt. In diesen Tieren ist sowohl die Aktivierung von *K-ras*<sup>G12D</sup> als auch die Deletion von *Tp53* epithelzellspezifisch.

# 3.1.3 K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>

Der *Ink4a/Arf*-Lokus kodiert für die Zellzyklusinhibitoren p16<sup>lnk4a</sup> und p19<sup>Arf</sup>. Eine Kreuzung aus *Villin-Cre-LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>- und *Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Mäusen (Serrano et al., 1996) resultiert in einer epithelzellspezifischen Aktivierung von *K-ras*<sup>G12D</sup> in Kombination mit einer den ganzen Orgnanismus betreffenden Deletion der Exons 2 und 3 des *Ink4a/Arf*-Lokus. Die Deletion führt zur Inaktivierung von *p16<sup>lnk4a</sup>* und *p19*<sup>Arf</sup> gleichzeitig. Die Mäuse mit dieser Kombination wurden als *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> bezeichnet.

# 3.1.4 K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>/Tp53<sup>-/-</sup>

Für die Ermittlung der Rolle von *Tp53* in *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen wurde die *Tp53*<sup>-/-</sup>-Maus mit der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus verkreuzt, was in einer zusätzlichen epithelzellspezifischen Deletion von *Tp53* in diesen Tieren resultierte. Die Mäuse wurden *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>/Tp53<sup>-/-</sup> genannt.

## 3.1.5 K-ras<sup>G12DInt</sup>/MIh-1<sup>-/-</sup>

Für die Ermittlung des Effektes des *DNA-Mismatch*-Reperatur-Enzyms Mlh-1 in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus wurden *Mlh-1<sup>-/-</sup>*-Mäuse *mit K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen verkreuzt. Durch die Deletion eines Fragments am 5' Ende des Gens wird ein kompletter Verlust von Mlh-1 im gesamten Tier erreicht (Edelmann et al., 1996). Die auf diese Weise erhaltenen Tiere wurden *K-ras*<sup>G12DInt</sup>/*Mlh-1<sup>-/-</sup>* genannt.

## 3.1.6 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurden Schwanzspitzen der Mäuse geschnitten und über Nacht in 100  $\mu$ l Lysepuffer mit 5  $\mu$ l ProteinaseK (Qiagen, #1017738) bei 60°C lysiert. Daraufhin wurde die ProteinaseK für 10' bei 95°C inaktiviert und die Proben mit H<sub>2</sub>O auf 1 ml aufgefüllt, um die DNA zu verdünnen. Die Proben wurden bei 13200 rpm für 10' zentrifugiert und bei 4°C gelagert.

Die PCR wurde mit den entsprechenden Primern bei entsprechenden Konditionen (siehe Anhang) mit 1,5 µl DNA durchgeführt und auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (1,5%) analysiert.

Einfacher PCR-Ansatz:	10x PCR Puffer	2 µl
	50 mM MgCl <sub>2</sub> (2 mM Endkonzentration)	0,8 µl
	100 mM dNTP Mix	0,4 µl
	20 pMol Forward Primer	0,5 µl
	20 pMol Reverse Primer	0,5 µl
	Taq Polymerase (5U/µl)	0,15 µl
	DNA	1,5 µl
	H <sub>2</sub> O	14,15 µl

Lysepuffer:

1,5 M Tris/Hcl 200 mM NaCl 0,2% SDS

	5 mM EDTA		
	500 ml destilliertes H <sub>2</sub> O		
PCR Bedingungen:	(jeweils 35 Zyklen und eine initiale Denaturierung bei 94°C für 5´)		
	Cre: (2 mM MgCl)	94°C 30″	
		58°C 30′′	
		72°C 30′′	
		4°C ∞	
	K-ras: (2 mM MgCl)	94°C 30′′	
		60°C 30″	
		72°C 1′	
		4°C ∞	
	Ink4a/Arf: (2 mM MgCl)	94°C 30′′	
		60°C 2′	
		72°C 1′	
		4°C ∞	
	p53: (2mM MaCl)	94°C 30′′	
		58°C 30′′	
		72°C 30′′	
		4°C ∞	
	Mlh-1: (1,5 mM MgCl)	94°C 30′′	
		60°C 2′	
		72°C 1′	
		4°C ∞	

#### 3.1.7 Magnetresonanztomographie (MRT)

Für ein MRT wurden die Tiere zuvor 8 Stunden ohne Futter gehalten, um das bei der Analyse entstehende Hintergrundrauschen zu minimieren. Vor der Durchführung wurden die Tiere mit einer dem Körpergewicht angepassten Dosis MMF (Kombination aus Midazolam (5  $\mu$ g/g), Medetomidin (0,5  $\mu$ g/g), und Fentanyl (0,05  $\mu$ g/g)) durch eine intraperitonale Injektion narkotisiert. Durch eine rektale Gabe des Kontrastmittels Supravist in einer Verdünnung von 1:250 und einer dreidimensionalen Auflösung von 0.4 mm konnte die Dicke der Kolonmukosa detektiert werden.

Zur Antagonisierung der Narkose wurde eine dem Körpergewicht der Maus angepasste Dosis AFN (Kombination aus Atipamezol (2,5  $\mu$ g/g), Flumazenil (0,5  $\mu$ g/g) und Naloxon (1,2  $\mu$ g/g)) intraperitonal verabreicht.

#### 3.1.8 BrdU (Bromdesoxyuridin)-Injektion

BrdU ist ein Analog des Nukleosids Thymidin und kann während der Replikation in der S-Phase in den neu synthetisierten DNA Strang anstelle von Desoxythymidintriphosphat eingebaut werden. Mittels Immunohistochemischer Färbung kann BrdU im Zellkern nachgewiesen werden.

Um proliferierende Zellen im Gewebe zu markieren, wurden die Mäuse mit 75  $\mu$ g/g BrdU (Sigma, #B5002) intraperitonal (i.P) injiziert. Die Organe wurden entnommen, fixiert und wie unter 3.2 beschrieben mit  $\alpha$ -BrdU gefärbt.

## 3.1.9 AOM (Azoxymethan)-Injektion

AOM ist ein Karzinogen, welches zur Induktion von Kolontumoren bei Mäusen verwendet wird. Die Tumoren bilden sich nach merhmaliger Injektion im mittleren und distalen Kolon.

Tiere auf einem FVB.129 Hintergrund wurden für den Zeitraum von 6 Wochen wöchentlich intraperitonal mit 10 mg/kg Azoxymethane (Sigma, #A2853) injiziert. Die Tiere wurden wöchentlich auf Zeichen eines Leidens kontrolliert und gewogen. 16 Wochen nach der ersten Injektion wurden die Tiere getötet und das Kolon für histologische Analysen entfernt.

## 3.1.10 Alter der für die Experimente verwendeten Tiere

Sämtliches Gewebe, isolierte Epithelzellen für proteinbiochemische Versuche und RNA-Analysen sowie histologische Präparate für Paraffinschnitte stammen, falls nicht anders angegeben, von 12-16 Wochen alten Tieren.

## 3.1.11 Anfertigung von Darmrollen

Bei der Sektion der Mäuse wurde der gesamte Darm entnommen, mit PBS rein gespült und in die verschiedenen Abschnitte des Dünndarms - Duodenum, Jejunum und lleum (jeweils ein drittel der Länge) - und Kolon eingeteilt. Die Abschnitte wurden der Länge nach aufgeschnitten und als "swiss-roll" aufgerollt. Für histologische Analysen wurde die Rolle in 4% PFA über Nacht bei 4°C fixiert, dehydriert (Leica, ASP300S) und später in Paraffin eingebettet. Für die Herstellung von Kryoschnitten wurde die Rolle 2 Stunden lang in 4% PFA fixiert, für 3 Stunden in einer 15% Sukroselösung und anschließend über Nacht in einer 30% Sukroselösung zur Dehydration inkubiert. Das Gewebe wurde mit Kryo-Einbettmedium bedeckt und (Jung, #0201 08926) bei -70°C schockgefroren.

## 3.1.12 Gewebeproben/Tumorproben

Der Darm der Mäuse wurde, wie bei der Isolierung der Epithelzellen beschrieben, präpariert und in Stücke geschnitten. Tumoren wurden mit einer Schere am Ansatz von der Lamina getrennt. Die Stücke wurden für spätere DNA-, RNA- oder Proteinanalysen sofort in Eppendorftubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

# 3.2 Histologische Färbungen

# 3.2.1 Methylenblau-Färbung

Für eine makroskopische Begutachtung des Kolonepithels der Mäuse wurde nach Tötung des Tieres das Kolon entnommen, mit PBS gespült und der Länge nach aufgeschnitten. Das geöffnete Kolon wurde mit Nadeln auf einen Streifen Whatman Papier befestigt und in 4% PFA über Nacht fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit 70% Ethanol und danach mit PBS gewaschen. Das Kolon inkubierte in einer Methylenblau-Lösung für 1' inkubiert, wurde danach in PBS gewaschen und unter einem Dissektionsmikroskop begutachtet bzw. fotografiert.

# 3.2.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H+E)

Für die Begutachtung der Histologie wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Das zuvor in 4% PFA fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und mit einem Microtom (Mikrom HM355S) in einer Dicke von 3 µm geschnitten. Die

Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad geglättet und zum Trocknen auf einen Objektträger transferiert. Vor der Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Das Gewebe wurde 1' mit Hämatoxylin (Vector Laboratories, #H3401) gefärbt und danach mit Wasser gewaschen. Nach einer Inkubationszeit von 10'' in einer 3%igen Eosinlösung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert.

#### **Rehydration**

2x in Xylol für je 10' 2x in 100% Ethanol für je 2' 2x in 96% Ethanol für je 2' 2x in 80% Ethanol für je 2' 2x in 70% Ethanol für je 2' 2x in 50% Ethanol für je 2' PBS 5 '

#### **Dehydration**

2x in 50% Ethanol für je 2' 2x in 70% Ethanol für je 2' 2x in 80% Ethanol für je 2' 2x in 96% Ethanol für je 2' 2x in 100% Ethanol für je 2' 1x in Xylol für 5'

Nach der Dehydration wurden die Schnitte getrocknet und mit *Mounting Medium* (Vector Laboratories, #H5000) eingedeckt.

<u>Eosin-Lösung:</u>	3% Eosin Y Disodium Salt in destilliertem H <sub>2</sub> O
	15 Tropfen Essigsäure auf 250 ml

#### 3.2.3 Alcianblue-Färbung

Die Präparation sowie die Rehydration und Dehydration der Schnitte erfolgte wie bei der H&E Färbung beschrieben.

Nach der Rehydration wurden die Schnitte 20' in der Alcianblue-Lösung inkubiert, anschließend mit Wasser gewaschen und 5' mit Nuklear Fast Red (Vector

Laboratories, #H3403) gegengefärbt. Nach erneutem Waschen der Schnitte mit Leitungswasser wurden sie dehydriert und mit *Mounting Medium* eingedeckt.

<u>Alcianblue-Lösung</u>: 100ml destilliertes H<sub>2</sub>O 3% Essigsäure 1g Alcian Blue

#### 3.2.4 Azure-Eosin-Färbung

Die Präparation sowie die Rehydration der Schnitte erfolgte nach dem schon bei der H&E-Färbung beschriebenen Ablauf (3.2.2).

Nach der Rehydration wurden die Schnitte zwei Stunden lang in der Azure-Eosin-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Die Dehydration erfolgte für 1' in 96% Ethanol und 2' in 100% Ethanol, gefolgt von einer Inkubation in Xylol für 5'.

Azure-Eosin-Lösung:	80 ml destilliertes H <sub>2</sub> O	
	9 Tropfen Essigsäure	
	10 ml 0,1% Eosin-Lösung	
	5 ml 0,1% Azure II-Lösung	

#### 3.2.5 SA-β-Galaktosidase-Färbung

Ein Indikator für seneszente Zellen ist die Anreicherung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase.

Bei der SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung wird das Substrat X-Gal durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase verdaut. Bei der Reaktion entsteht eine blaue Färbung in den Zellen, deren Intensität von der Menge des vorhandenen Enzyms abhängt.

Die SA-β-Galaktosidase-Färbung wurde mit dem Kit von Cell Signaling (#9860) durchgeführt.

Das Gewebe wurde am Kryotom (Mikrom HM560) in einer Dicke von 6µm geschnitten und auf Objektträger transferiert. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie 10' in PBS inkubiert, um Reste des Einbettmediums auszuwaschen. Danach wurde das Gewebe 15' lang mit einer Fixierlösung aus dem Kit fixiert und anschließend mit einer X-Gal Färbelösung bei 37°C inkubiert. Die optimale Färbung wurde mittels Mikroskop in regelmäßigen Abständen kontrolliert und nach 4 bis 12 Stunden gestoppt.

#### 3.2.6 Immunohistochemische Färbungen (IHC)

Für IHC Färbungen wurden das Avidin/Biotin Kit (Vector Laboratories, Blocking Kit, SP-2002), das ABC Kit (Vector Laboratories, ABC Staining Kit, PK-6100) und das DAB Kit (Vector Laboratories, Peroxidase Substrate Kit, Sk-4100) verwendet.

Die Präparation sowie die Rehydration und Dehydration der Schnitte erfolgte wie bei der H&E Färbung beschrieben (3.2.2).

Für nukleäre Färbungen wurden die Schnitte für 20' in einer Natriumzitratlösung gekocht, anschließend für 30' abgekühlt und mit PBS gewaschen. Für zytoplasmatische Färbungen wurden die Schnitte in 0,3% Triton für 10' inkubiert und Bei beiden Varianten folgte für 10' danach mit PBS gewaschen. ein Wasserstoffperoxidblock mit einer 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS Lösung. Nach dem Avidinblock in 3% BSA/PBS plus Avidin (2 Tropfen auf 1 ml) wurde der primäre Antikörper (siehe Anhang) in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:500 in 3% BSA/PBS plus Biotin (2 Tropfen auf 1 ml) für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein mit Biotin markierter sekundärer Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA/PBS auf die Schnitte pipettiert und für 30' inkubiert. Während der Inkubation des sekundären Antikörpers wurde der ABC-Komplex, ein Komplex aus Avidin DH und biotinylierter Horseradish Peroxidase (je 2 Tropfen auf 5 ml PBS) für 30' bei 4°C gebildet. Für die DAB (3, 3'-Diaminobenzidine) Farbreaktion wurden 2 Tropfen Puffer, 2 Tropfen Peroxidase, und 4 Tropfen DAB-Lösung in 5 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Die Färbung dauerte je nach Antikörper zwischen 30" und 10". Nach der Färbung wurden die Schnitte in H<sub>2</sub>O gewaschen, 1' mit Hämatoxylin gefärbt, erneut gewaschen, rehydriert und mit *Mounting Medium* eingedeckt (siehe H&E Färbung).

#### 3.2.7 Immunfluoreszenz (IF)

Die Behandlung der Schnitte bei der IF wurde weitgehend auf die gleiche Art durchgeführt, wie bei der IHC beschrieben (3.2.6).

Nach dem Kochen mit Natriumacetat oder der Tritonbehandlung wurde jedoch statt mit Avidin beziehungsweise Biotin 30' mit 3% BSA/PBS geblockt. Im Anschluss daran wurde der primäre Antikörper für 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ein sekundärer Antikörper mit einer Fluoreszenz bei der Wellenlänge 488 nm (grün) oder 594 nm (rot) wurde nach dem Waschen der Schnitte für 30' in einer Konzentration von 1:1000 gebunden. Abschließend wurden die Schnitte mit DAPI-

enthaltendem, wässrigem Eindeckmedium (Invitrogen, #P36931) konserviert und bei 4°C dunkel gelagert.

## 3.2.8 TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

Mit dem TUNEL kann eine durch Apoptose bedingte Fragmentierung der DNA nachgewiesen werden.

Die Präparation sowie die Rehydration der Schnitte erfolgte wie bei der H&E Färbung beschrieben (3.2.2). Für die Färbung wurden das Kit von Clontech (ApoAlert DNA-Fragmentation Assay, #630108) und das Protokoll für PFA-fixierte. paraffineingebettete Proben verwendet. Nach der Rehydration wurden die Schnitte für 5' mit einer 0,85% Natriumacetatlösung inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde danach für 15' in 4% PFA fixiert, gewaschen und daraufhin 5' mit einer 20 µg/ml ProteinaseK-enthaltenden Lösung behandelt. Die Schnitte wurden mit jeweils 50µl Equilibrierungspuffer für 15' bedeckt und anschließend 1 Stunde lang mit einer Lösung aus Enzym, Nukleotidmix und Puffer bei 37°C inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln vollzogen. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion für 15' mit einem 2x SSC-Puffer Abschließend wurden die Schnitte mit DAPI-enthaltendem abgestoppt. Eindeckmedium konserviert und bei 4°C dunkel gelagert.

Enzym/Nukleotidmix pro Probe: 30 μl Equilibrierungspuffer 3 μl Nukleotidmix 0,33 μl TdT Enzym

# 3.3 RNA/DNA Analysen

## 3.3.1 RNA Isolation

Die gesamte RNA aus frischem oder in -80°C gelagertem Gewebe und von Zellkulturen wurde zunächst in RLT-Puffer inklusive 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol homogenisiert und danach mit dem RNeasy Kit (Qiagen, RNeasy Kit, #74106) entsprechend dem Herstellerprotokoll über eine Säule aufgereinigt und die RNA in EB-Puffer eluiert.

## 3.3.2 Microarray Analyse

Die Genexpressionsprofile der untersuchten Tumoren der verschiedenen Mauslinien wurden unter Verwendung des Affymetrix Gene ST GeneChip (~28.000 Gene des Mausgenoms) druchgeführt. Als Proben wurde RNA verwendet, die zuvor wie in 3.3.1 beschrieben aus dem entsprechenden Gewebe isoliert wurde. Die Auswertung erfolgte dann unter Verwendung der SAM 3.0 Software (Significance Analyse of Microarrays).

## 3.3.3 cDNA Synthese

Für die Herstellung der cDNA wurde 1 µg RNA eingesetzt. Für die reverse Transkription wurden die Proben zunächst mit Oligodeoxythymidin (Oligo(dt)) (invitrogen) und dNTP (Invitrogen) 5' bei 65°C angelagert, danach 50' bei 50°C mit Super SSRTII (Invitrogen) und RNaseOut (Invitrogen) inkubiert. Die fertige cDNA wurde vor dem Einsatz bei der RT-PCR im Verhältnis 1:4 verdünnt.

#### Mastermix:

1μg RNA 1μl Oligo(dt) 1μl dNTP 10 mM x μl H2O dest. 4μl 5x Puffer 1μl 0,1mM DTT 1μl SSRTII 1μl RnaseOut Endvolumen: 20 μl

# 3.3.4 RT-PCR

Die RT-PCR lief mit den entsprechenden Primern mit dem StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) unter Verwendung des SYBR Green MasterMix (Rox) (Roche, 14879600) durchgeführt. Die jeweiligen spezifischen Primer wurden mit der Software Primerexpress 1.0 entworfen und auf eine Konzentration von 20 mM eingestellt (Sequenzen im Anhang). Die Auswertung der PCR erfolgte mit der StepOne Software v2.0.2. Die Werte wurden gegen das Housekeeping Gen Cyclophilin normalisiert. Die Berechnung zur absoluten Bestimmung der Werte erfolgte anhand der exponentiellen Gleichung 2<sup>DeltaCtWert Cyclophilin - DeltactWert Zielgen</sup>.

Mastermix für eine Probe: 9,5 µl H20 dest

12,5 μl Syber Green PCR Mastermix
0,5 μl cDNA
2,5μl Primermix (20mM forward, 20mM reverse)
50°C 2'
95°C 10'

60°C 1*′* 

für 40 Zyklen

95°C 30''

## 3.3.5 DNA Extraction

**RT-PCR Programm**:

Die DNA Extraktion erfolgte mit einem Kit von Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit, #69506) nach dem Protokoll des Hersteller. Das Gewebe beziehungsweise die Zellen wurden in einem ProteinaseK-enthaltenden Puffer über Nacht bei 56°C inkubiert, am nächsten Tag mit dem Kit über eine Säule aufgereinigt und schließlich die DNA mit TE Puffer eluiert.

## 3.3.6 Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten

Für die Aufreinigung der DNA wurde ein Kit von Qiagen benutzt (Qiamp DNA Micro Kit, #56304).

Um DNA aus Paraffinschnitten zu extrahieren, wurden zunächst Schnitte in einer Dicke von 8 µm angefertigt und wie unter 3.2.2 beschrieben rehydriert und gefärbt. Nach dem finalen Schritt der Dehydration in 100% Ethanol wurden die Schnitte getrocknet. Bei größeren Tumoren wurde die DNA direkt vom Objektträger mit einem ProteinaseK-enthaltendem Puffer vorsichtig abgekratzt und die Zellen in diesem Puffer über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte anhand der Anweisungen des verwendeten Kits.

# 3.3.7 Laser-Mikrodissektion (Laser capture microdissection (LCM))

Zur Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten von kleinen Tumoren wurde ein Laser-Mikrodissektionsmikroskop verwendet (Nikon Eclipse TE200). Die Paraffinschnitte wurden auf spezielle Objektträger gebunden (Medite, Membrane Slides for Microdissection, #50103) und mit H&E wie beschrieben gefärbt und getrocknet. Mit Hilfe des Mikroskopes konnten spezifische kleine Bereiche der Tumoren aus den Objekträgern herausgeschnitten werden. Aus den Zellen wurde unter Verwendung des Qiamp DNA Micro Kit die DNA isoliert (siehe 3.3.6)

#### 3.3.8 Methylierungsanalyse von DNA aus Mausgewebe

Zur Vorbereitung für die Methylierungsanalyse wurde DNA aus fünf *K-ras<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>* Tumoren und von 4 Kontrolltieren wie unter 3.3.6 beschrieben mit einem Kit (Qiagen) isoliert. Die DNA aus den 5 Tumoren wurde zu einer "Tumor-Probe" zusammengefasst, die DNA aus den Kontrolltieren wurde zu einer "Kontroll-Probe" zusammengefasst. Die Analyse wurde von der Firma ImaGenes GmbH in Berlin durchgeführt. Die DNA Proben wurden zunächst einem RNase-Verdau unterzogen und durch einen Restriktionsverdau fragmentiert. Methylierte Fragmente wurden unter Verwendung des Methyl-Binding-Domain-2 Proteins (MBD2) durch eine Immunpräzipitation angereichert, anschließend auf einem *NimbleGen 385K MM8 RefSeq Promoter Array* hybridisiert und schließlich ausgewertet.

## 3.4 Klonierung

#### 3.4.1 Mutations analyse von TP53, $\beta$ -catenin und Tgf $\beta$ RII

Für die Mutationsanalyse von *TP53* und *β-catenin* wurde der Vektor pBluseskript II KS+ einem Restriktionsverdau mit EcoRI (New England Biolabs, #R0101S) unterzogen. Hiefür wurde 1 µg Vektor mit 1 µl Enzym in 1x EcoRI Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zum Dephosphorilieren des verdauten Vektors 1 µl CIP (NEB, Calf Intestinal Alkaline Phostphatase, #M0290S) hinzugegeben und weitere 30' bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde zur Überprüfung eines kompletten Verdaus über ein 1% ethidiumbromidhaltiges Agarosegel laufen gelassen, und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Zur Aufreinigung wurde das Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, #28706) verwendet.

Für die Klonierung des Inserts wurden für die Exons der gewünschten Gene (Exon 5 - 8 bei *TP53*, Exon 3 bei  $\beta$ -catenin, Exon 5 - 7 bei *Tgf* $\beta$ *RII*) spezifische Primer entworfen, die zusätzlich mit einer Schnittstelle für das Enzym EcoRI ausgestattet waren. Mit der aus Tumoren extrahierten DNA wurde dann eine PCR durchgeführt, die zur Amplifizierung des gewünschten Exons führte, welches entsprechend von EcoRI Schnittstellen flankiert war. Nach Auftrennung auf einem Agarosegel wurde

das spezifische Produkt ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und anschließend mit dem Enzym EcoRI wie bereits für den Vektor beschrieben 1 Stunde bei 37°C verdaut. Am Ende wurde das Produkt mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits über eine Säule aufgereinigt.

#### 3.4.2 Klonierung für die Herstellung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

Für diese Klonierung wurd der Vektor pGEX4t verwendet. Zunächst wurde die cDNA Sequenz des gewünschten Proteins mittles einer PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das 5` Ende jeweils eine Enzym Schnittstelle aufwies. Nach Amplifizierung des Gens wurde das Produkt aus einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel ausgeschnitten und anhand der Anweisungen des Herstellers mit einem Kit von Qiagen (Qiaquick Gel Extraction Kit, #28706) aufgereinigt. Das Fragment wurde mit dem entsprechenden Enzym für 1 Stunde bei 37°C verdaut, erneut über eine Säule aufgreinigt und in den ebenfalls verdauten, linearisierten und aufgereinigten pGEX4T Vektor ligiert.

## 3.4.3 Ligation

Die Ligation der verdauten DNA wurde mit T4 Ligase (Invitrogen, #15224-017) in dem entsprechenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 20µl über Nacht bei 4°C erreicht. Das Verhältnis von Vektor : Insert wurde 1:3 gewählt.

#### 3.4.4 Transformation

Für die Mutationsanalysen wurden E.coli Baktereien vom Stamm XI-1 blue verwendet. Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden E.coli BL21 Zellen verwendet, da diese Zellen wegen fehlender Protease und einer sehr hohen Expressionseffizienz von rekombinaten Proteinen besonders geeignet sind. Von den entsprechenden Bakterien wurden 100 µl pro Probe in Eppendorftubes für 5' bis 10' auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden anschließend 2 µl der Ligation gegeben und das Gemisch für 30' auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte in einem Wasserbad für 45`` bei 42°C. Nach einer Inkubation von 2' auf Eis wurden 700 µl LB Medium zu den Zellen gegeben und diese für 50' bei 37°C und 600 rpm in einem Heizblock geschüttelt. Ausplattiert wuden die Zellen auf LB-Agar Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden über Nacht (12-16 Stunden) in einen 37°C Inkubator gestellt.
<u>LB-Medium:</u> 20 g Trypton 10 g Hefextract 20 g NaCl auf 2 l destilliertes H<sub>2</sub>O

#### 3.4.5 Miniprep und Plasmid DNA Isolation aus Bakterien

Für die Isolation von Plasmid DNA aus einer Bakterienkultur wurde ein Kit (Qiaprep Spin Miniprep Kit, #27106) und das Protokoll für die Isolation mit einer Minizentrifuge verwendet. 1,5 ml einer Bakterienkultur, die über Nacht in LB-Medium inklusive der nötigen Antibiotika bei 37°C und 250 rpm geschüttelt wurde, wurde in ein Eppendorftube transferiert und bei 13200 rpm für 10' abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer P1 resuspendiert, und die Zellen durch Zugabe von Puffer 2 lysiert. Nach Zugabe von Puffer 3 wurde das Präzipitat erneut 10' bei 13200 rpm abzentrifugiert und die DNA in dem Überstand auf eine Säule gebunden, gewaschen und mit 40 µl Elutionspuffer in ein Eppendorftube eluiert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Spektrometer bestimmt. Die DNA wurde zur Sequenzierung gegeben (GATC Biotech, Konstanz) und die Sequenz anschließend entweder entsprechend auf Mutationen überprüft (Mutationsanalysen) oder die korrekte integration des Inserts in den Vektor bestätigt (Herstellung der GST-Fusionsproteine).

#### 3.5 Proteinbiochemie

#### 3.5.1 Isolation von intestinalen Epithelzellen

Zum Isolieren der Darmepithelzellen der Mäuse wurde der Darm entnommen, mit PBS gespült und in die 4 Abschnitte eingeteilt (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon). Der Darm wurde daraufhin der Länge nach aufgeschnitten und etwa ein Drittel für die Epithelzellisolierung in kleine Stücke zerschnitten. Die Stücke wurden in einem 50 ml Falcon im 37°C Inkubator unter leichtem schütteln in HBSS mit 30 mM EDTA für 8' inkubiert, um das Epithel von der Lamina Propria zu lösen. Nach der Inkubation wurde das Gewebe im Falcon für 30'' gevortext und sofort auf Eis gestellt. Der Überstand mit den Epithelzellen wurde in ein 15 ml Falcon transferiert und bei 5000 rpm für 5' zentrifugiert. Das Epithelzellpellet wurde mit PBS gewaschen, in Eppendorftubes überführt, 5' bei 5000 rpm zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Zellen bei -80°C.

#### 3.5.2 Proteinlyse

Um ein Gesamtproteinlysat aus Gewebe oder zuvor isolierten Epithelzellen herzustellen, wurden die bei -80°C gelagerten Pellets in Proteinlysepuffer in einem Eppendorftube homogenisiert. Für eine komplette Lyse der Zellen wurden die Proben für 10' auf Eis gestellt. Anschließend wurden Zelltrümmer bei 13200 rpm für 10' abzentrifugiert und das Proteinlysat bei -80°C gelagert.

Lysepuffer Stock:	50 mM Tris HCl pH 7,5					
	250 mM NaCl					
	3 mM EDTA					
	3 mM EGTA 1%Triton 0,5% NP40					
				10% Glycerol		
				25 mM Natrium Pyrophosphat		
	eine Tablette Protease-Inhibitoren (Roche,					
	#11697498001) auf 50 ml Lysepuffer (Inhibition					
	gegen Chymotrypsin, Pancreasextract, Papain,					
	Pronase, Thermolysin, Trypsin)					
	<u>10 ml Lysepuffer Komplett:</u>	8,2 ml Lysepuffer inklusive Protease-Inhibitoren				
		10 µl 1 M DTT				
500 μl 1 M β-Glycerolphosphat						
500 μl 500 mM NaF						
200 µl 100 mM Na PMSF						
500 µl 100 mM Na Orthovanadat						

#### 3.5.3 Westernblot

Für den Westernblot wurden Kammern des Typs "BioRad Mini Protean Gel System" genutzt. Zum Lysieren der Zellen wurden die Pellets beziehungsweise das Gewebe in Lysepuffer homogenisiert, 10' auf Eis inkubiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. Dazu wurden 2 µl Proteinlysat auf 1 ml 1:5 verdünnten BioRad Proteinassay (#500-0006) pipettiert und quantitativ bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrometer (BioRad SmartSpec Plus)

gemessen. Die Konzentrationen der einzelnen Proben berechneten sich anhand einer BSA Standardreihe, die mit den Konzentrationen 0,3125 bis 5  $\mu$ g/ $\mu$ l gemessen wurde. Für den Versuch wurden etwa 50  $\mu$ g Protein jeder Probe verwendet. An die Messung angeglichene Proteinmengen wurden mit Lämmlipuffer inklusive 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol 5' bei 95°C denaturiert und auf ein 10-15% Polyacrylamidgel aufgetragen. SDS-Page (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde bei 120 Volt in 1x Laufpuffer durchgeführt.

- Lämmli-Puffer:3,55 ml H2O dest1,25 ml Tris HCI 0,5 M pH6,82,5 ml Glycerol2 ml 10% SDS0,2 ml Bromphenol Blauβ-Mercaptoethanol (Endkonzentration 5%)
- Sammelgelpuffer: 6 g Tris 0,04% SDS in 100 ml destilliertes H<sub>2</sub>O, pH 6,8
- Trenngelpuffer:18 g Tris0,04% SDS in100 ml destilliertes H2O, pH 8,8
- Gel 12%:2,5 ml 40% Acrylamid4,4 ml H2O0,1 ml SDS2,5 ml Sammel- bzw. Trenngel Puffer.Trenngel: 50 μl 10% Ammoniumpersulfat und 5 μl TEMEDSammelgel:10 μl beim Sammelgel TEMED.
- <u>10x Laufpuffer:</u> 30,3 g Tris 144,1 g Glycine 10 g SDS in 1000 ml H<sub>2</sub>O

Die aufgetrennten Proteine in dem Gel wurden bei 400 mA für 60'auf eine mit Methanol für 15'' aktivierte PVDF Membran (Zefa Laborservice, Immobilon-P, Z.IPVH00010) transferiert. Für den Transfer wurde das Gel auf der Membran zwischen 2 Zelluloseschwämme (außen) und 2 Filterpapiere (innen) eingespannt. Während des Transfers wurde der Behälter gekühlt.

<u>10x Transferpuffer:</u> 14,5 g Tris (12 mM)

72 g Glycine (96 mM) in 1000 ml  $H_2O$  dest

1x Transferpuffer:100 ml 10x Transferpuffer200 ml Methanol700 ml H2O

Nach dem Transfer wurde die Membran für 30' in 3% Magermilch in PBST (0,1% Tween) geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Membran wurde anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Anhang) in einer Konzentration von 1:500 bis 1:1000 in 3% BSA/PBST für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

Ein in 3% Milch/PBST gelöster HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (GE Healthcare, Horseradish peroxidase konjugated, siehe Anhang) wurde für 30' in einer Verdünnung von 1:5000 in 3% Milch/PBST auf die Membran gegeben, nachdem die Membran dreimal für je 5' mit PBST gewaschen wurde. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Membran erneut dreimal für je 5' in PBST gewaschen und daraufhin für die Detektion mit einer ECL-Lösung (Thermo, Super Signal West Pico, #1856135/36 oder Super Signal West Femto, #1859022/23) 5' lang inkubiert. Die Proteinbanden wurden mit einem Röntgenfilm nachgewiesen.

#### 3.5.4 Kinase Assay

Bei dem Kinase Assay wird die Aktivität einer Kinase bestimmt. Durch eine Immunpräzipitation (IP) mit einem Antikörper gegen eine bestimmte Kinase wird ein Proteinlysat mit ProteinA Sepharose (GE Healthcare, ProteinA Sepharose 6MB, #17-0469-01) inkubiert und dadurch die Kinase isoliert. Zugabe des Subtrates und radioaktivem [ $\gamma$ -32P]-ATP zu der Kinase führt zur Phosphorilierung und Markierung des Substrates mit dem ATP und kann nach Auftrennung auf einem

Polyacrylamidgel und anschließendem Westernblot-Verfahren mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

Zunächst wurden 15 µl Protein Sepharose pro Probe dreimal mit der fünffachen Menge an Proteinlysepuffer gewaschen. Zum Pipettieren wurde die Pipettenspitze mit der Schere gestutzt. Nach jedem Schritt wurde die ProteinA Sepharose bei 2000 rpm für 2' abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde die ProteinA Sepharose in 50 µl Lysepuffer pro Probe resuspendiert und 0,5 µl - 1 µl Antikörper pro Probe hinzugegeben. Für die IP wurden ca 200 µg - 300 µg Protein aus dem Gesamtlysat mit je 50 µl Protein Sepharose inklusive Lysispuffer und Antikörper in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 4 Stunden bei 4°C gerollt. Daraufhin wurde die Sepharose zweimal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen und in 500 µl 1x Kinasepuffer resuspendiert und 20' lang bei 4°C gerollt. Dann wurde erneut bei 2000 rpm für 2' zentrifugiert und auf jede Probe 15 µl 2x Kinasepuffer gegeben. Die Proben mit der Protein Sepharose wurden mit einem vorbereitetem Mastermix aus 10 mM ATP-Lösung, 1 µg Substrat pro Probe, 0,5  $\mu$  [ $\gamma$ -32P]-ATP pro Probe und H<sub>2</sub>O auf insgesamt 30  $\mu$ l aufgefüllt und die Kinasereaktion 30' lang bei 30°C erwärmt. Um die Proteine zu denaturieren wurde zu jeder Probe 12 µl Lämmlipuffer pipettiert und alles für 5' auf 95°C erhitzt. Nach einer Zentrifugation von 5' bei 13000 rpm wurden von jeder Probe 20 µl auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Auftrennung auf eine PVDF Membran geblottet (siehe auch 3.5.3). Die Bande des radioaktiv markierten Substrates konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms über Nacht bei -80°C nachgewiesen werden.

<u>10x Kinasepuffer:</u> 0.25 M HEPES pH 7,5 (50 ml 0.5 M/100 ml) 1.5 M NaCl (7.92 g/100 ml) 0.25 M β-Glycerophosphat (5.4 g/100 ml) 0.1 M MgCl<sub>2</sub> (0.95 g/100 ml)

ATP-Lösung:10 mM ATP (50μl 0.1M/0.5ml)100 mM Tris pH 7.5 (50 μl 1 M/0.5 ml)50 mM MgCl2 (25 μl 1 M/0.5 ml)10 mM DTT (5 μl 1 M/0.5 ml)ad H2O dest 370 μl

### 3.5.5 Herstellung von rekombinaten GST-Fusionsproteinen für den Kinase Assay

Als Substrat für den Kinase Assay dienten rekombinante Proteine, die durch die Klonierung in einen pGEX4T Vektor und die Expression in Bakterienzellen ein GST-*Tag* erhielten. Expremiert wurde das Protein dann als GST-Fusionsprotein, was es ermöglichte, das rekombinate Protein selektiv mithilfe von GST-Sepharose zu isolieren.

Nach Transformation des Vektors in BL21 Zellen und einer Inkubation im 37°C Brutschrank über Nacht wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für 12 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 400 ul der Kultur einer Flasche mit 200 ml LB-Medium inklusive Antibiotika zugefügt und etwa 3-4 Stunden bei 37°C geschüttelt, bis die Messung der OD<sub>600</sub> an dem Spektrometer einen Wert zwischen 0,4 und 0,5 anzeigte, die Bakterien also in der exponentiellen Phase der Wachstumskurve waren. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Bakterien mit 200 mg/ml einer 1 M IPTG Lösung induziert. Die Induktion mit IPTG führte in den Zellen zur Aktivierung des Lac-Operons und zur Transkription und Translation des gewünschten Proteins. Die Bakterien wurden für weitere 3 Stunden bei 37°C geschüttelt, in 50 ml Falcontubes gesammelt und bei 13200 rpm 10' zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml Suspensionspuffer inklusive 1 mg/ml Lysozyme resuspendiert und die Zellen mit dreimal 30" und jeweils 15" Pause mit Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden in einem 50 ml Falcon bei 12000 rpm für 20' bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Falcontube überführt.

Für 30 ml Proteinsuspension wurde 500 µl GST-Sepharose (GE Healthcare, Glutathione Sepharose 4B, #17-0756-01) dreimal mit Suspensionspuffer gewaschen und bei jeweils 2000 rpm für 5' zentrifugiert. Die gewaschenen Sepharose-Beads wurden zu der Proteinlösung gegeben und über Nacht bei 4°C gerollt. Daraufhin wurde die Sepharose, die nun das Protein gebunden hatten, mit 2000 rpm für 2' abzentrifugiert und zweimal mit 25 ml Puffer 1, zweimal mit 25 ml Base-Puffer und einmal mit 35 ml PBS gewaschen. Die Sepharose wurden in ein 1,5 ml Eppendorftube transferiert und mit 1 ml frischem Elutionspuffer 1h bei 4°C gerollt, um die Proteine von der Sepharose zu lösen. Dieser Schritt wurde nach Abnahme des Überstandes wiederholt. Die Elutionslösung mit den Proteinen wurde dann in eine Dialysemembran (Roth, ZelluTrans MWCO 12.000-14.000, #E674.1) pipettiert und 5

Stunden lang in 1 I Dialysepuffer gerührt. Der Puffer wurde einmal gewechselt und das Eluat über Nacht erneut gerührt. Das fertige Substrat wurde bei -80°C gelagert.

<u>Base-Puffer (500 ml):</u>	0,1 ml 0,5 M EDTA
	0,385 g DTT
	in 500 ml PBS
<u>Puffer 1 (200 ml):</u>	0,3 M Amoniumsulfat (7,88 g)
	in 200 ml Base-Puffer
Suspensionspuffer (100 ml):	Proteinaseinhibitoren (Roche)
	1Tablette/50 ml
	1 ml 100 mM PMSF
	in 100 ml Puffer 1
Elutionspuffer (frisch angesetzt):	100 mM Tris (0,85 g/70 ml)
	10 mM Glutathion (0,21 g/70 ml)
	70 ml destilliertes H <sub>2</sub> O, pH 8,0
Dialysepuffer (2 L):	10% Glycerol
	0,1 M NaCl (11,4 g/2L)
	0,2 mM EDTA (800 µl of 0,5 M/2 L)
	10 mM $\beta$ -Glycerophosphat (4,32 g/2 l)
	20 mM TrisHCl

#### 3.5.6 Ras-Assay

Um die Menge an aktivem, GTP-gebundenem Ras in einem Proteinlysat festzustellen, wurde ein GTP-Ras Pulldown Assay ausgeführt. Hierfür wurde das Kit von Upstate (#17-218) verwendet. Zu dem Proteinlysat wurde Raf-1 Agarose mit einer Ras-Bindungsdomäne gegeben, welches spezifisch das in dem Lysat vorhandene GTP-Ras, nicht jedoch das GDP-Ras bindet. Nach 45' Inkubationszeit wurden die Agarose-Beads dreimal mit MLB-Lysepuffer von nicht gebundenen Proteinen reingewaschen. Das Lysat wurde mit Lämmli-Puffer denaturiert und auf ein 15% Polyacrylamidgel aufgetragen um SDS Page-Gelelektophorese durchzuführen (siehe 3.5.3).

Die aufgetrennten Proteine wurden danach wie beim Westernblot beschrieben auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, mit Ras-Antikörper inkubiert und die spezifischen Banden mittels HRP-gekoppeltem sekundären Antikörper nachgewiesen.

#### 3.5.7 Ral Assay

Der Ral Assay wurde mit einem Kit von Upstate (#17-300) dürchgeführt und funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie der Ras Assay. Hierbei wurde Ral Binding-Protein1-Agarose eingesetzt, um aktiviertes Ral zu binden. Nachgewiesen wurden die spezifischen Banden im Westernblot mit dem Ral-Antikörper aus dem Kit.

#### 3.5.8 DNA-Affinitäts Präzipitations Assay (DAPA)

Durch den DAPA wurde die Bindungsaktivität von  $\beta$ -catenin an ein DNA-Oligo mit TCF-Bindungsdomäne Oligo nachgewiesen. Hierfür wurden 20 µl eines Oligos mit der TCF-Bindungssequenz mit einer Konzentration von 100 ng/µl mit 300 µg Proteinlysat aus Tumorzellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Oligo war am 5'Ende mit Biotin markiert. Nach der Inkubationszeit wurde 25 µl mit Lysepuffer gewaschene Streptavidin Agarose (Thermo Scientific, Streptavidin Agarose Resin, # 20349) zu dem Lysat gegeben und über Nacht bei 4°C gerollt. Daraufhin wurde die Agarose dreimal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen und je 1' bei 13200 rpm zentrifugiert. Zu der Agarose wurde 40 µl Lämmli-Puffer inklusive 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben und 5' lang bei 95°C gekocht. Die Proben wurden daraufhin auf ein 10% Acrylamidgel geladen und wie unter 3.5.3 beschrieben aufgetrennt, geblottet und entwickelt.

#### 3.6 Zellkultur

#### 3.6.1 Isolation von Tumorzellen aus dem Kolon zur Kultivierung in vitro

Für *in vitro* Experimente mit Tumorzellen wurden verschiedene Zelllinien aus Kolontumoren von Mäusen isoliert. Hierfür wurde ein Tumor mit einer Sezierschere an der Basis der Lamina Propria herausgeschnitten und in kleine Stücke zerlegt. Die Stücke wurden in PBS inklusive Antibiotika (PBS-A) in einer 60 mm Zellkulturschale mehrmals gewaschen und dann 20' in einer 0,04% Natriumhypochlorid-Lösung von Bakterien befreit. Der Tumor wurde erneut mit PBS-A gewaschen und nochmals

zerkleinert, bei 1500 rpm für 5' abzentrifugiert und in *Liver Digest Medium* (LDM) (Invitrogen, #17703034) inklusive Antibiotika resuspendiert und 90' lang bei 37°C leicht geschüttelt. LDM ist ein Kollagenase-Disapse-Medium, welches zur Dissoziation der Tumorzellen dient. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5' abzentrifugiert und nach der Resuspendierung in 2 ml LDM über Nacht in einen 4°C Kühlschrank gestellt.

Eine 24-well Zellkulturplatte wurde mit Matrigel (BD Pharmingen, Basement Membrane Mix, #356234) beschichtet und zur Polymerisation für wenige Minuten bei 37°C inkubiert. Die Tumorzellen wurden bei 1500 rpm für 5´ abzentrifugiert und zweimal mit RPMI 1640 Medium (Gibco, #21875-034) gewaschen, in RPMI 1640 + EGF resuspendiert, auf das Matrigel ausplattiert und im Brutschrank kultiviert.

PBS-A:10 μg/ml Gentamicin20 units/ml Penicillin20 μg/ml Steptomycin

RPMI Tumorzell-Medium:10 ng/ml EGF (Sigma, #E4127)1 ml/L ITS-X (Invitrogen, #51500-0560,5 μg/ml Fungizone (Gibco, #15290-016)Antibiotika (wie PBS-A)

Sobald die Zellen gut angewachsen beziehungsweise konfluent waren, wurden sie zunächst durch Waschen mit PBS, dann durch Zugabe von Accutase (PAA, #L11-007) von den Matrigel beschichteten Platten abgelöst, auf beschichtete Zellkulturschalen (Corning, CellBind Surface) transferiert und in RPMI 1640 Medium kultiviert.

#### 3.6.2 Kultivierung von Tumorzellen

Alle hier verwendeten Tumorzellen wurden in RPMI 1640 Medium in einem 37°C Brutschrank bei einer Zufuhr von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert, wenn sie konfluent waren. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann für 5' mit 0,25% Trypsin EDTA (Gibco, #25200-056) bei 37°C inkubiert und in frischem RPMI 1640 Medium resuspendiert und ausgesät.

#### 3.7 Statistische Auswertungen

#### 3.7.1 Bestimmung der Darmlänge

Die Darmlänge von sezierten Mäusen im Alter von 8-86 Wochen wurde mithilfe eines Lineals bestimmt. Es wurde das Kolon für sich und die drei Abschnitte Ileum, Jejunum und Duodenum zusammen als Dünndarm gemessen.

#### 3.7.2 Bestimmung der Villuslänge

Für die Bestimmung der Villuslänge im Jejunum und der Kryptentiefe im Kolon wurde die Anzahl der Enterozyten in H&E gefärbten Schnitten von je 5 Tieren in jeweils 10-15 im vollen Querschnitt erkennbaren Villi beziehungsweise Krypten bestimmt.

#### 3.7.3 Bestimmung der Proliferationsrate

Der Proliferationsindex im Jejunum und Kolon wurde aus der Auszählung von BrdUpositiven Zellen aus jeweils 12 Krypten von injizierten Mäusen bestimmt. Die Proliferationsrate im Tumor wurde durch eine Auszählung von 300 Zellen pro Tumor vorgenommen und der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen daraus errechnet.

#### 3.7.4 Signifikanzen

Die Daten sind mit berechnetem Standardfehler angegeben. Ab dem Wert  $p \le 0,05$  berechnet mit *Student's T-test* wurden die Ergebnisse als signifikant betrachtet. Die berechneten Signifikanzen wurden angegeben mit \*(<0,05), \*\*(<0,01) und \*\*\*(<0,001).

#### 3.7.5 Migrationsrate der Epithelzellen

Für die Bestimmung der Migrationsrate der Enterozyten im Dünndarm wurden Paraffinschnitte des Jejunum von jeweils zwei BrdU injizierten Tieren angefertigt, bei denen zum Zeitpunkt der Tötung die Injektion 1,5 Stunden, 24 Stunden oder 48 Stunden zurücklag. Die Schnitte wurden gegen BrdU wie unter IHC beschrieben gefärbt. Von Jedem Tier wurde in 20 im Querschnitt erkennbaren Krypten die Anzahl und die Position der BrdU-markierten Zellen innerhalb des Villus bestimmt und die daraus entstehenden Mittelwerte in einem Graphen dargestellt.

# 3.8 Methoden zur Untersuchung von humanen Geweben und Mikrosatelliteninstabilitäts (MSI)-Analyse

Folgende Experimente wurden in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians Universität in München durchgeführt.

#### 3.8.1 MSI-Analyse

Für die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität in den Tumoren der Mäuse wurden 5 verschiedene Repeat-Marker (TG27, TA27, GA27, CT25CA27, A33) getestet (Kabbarah O, 2003). Zunächst wurde eine PCR mit Fluoreszenz-markierten Primern (siehe Anhang) mit der zuvor isolierten Tumor-DNA und zur Kontrolle mit der DNA von gesundem Lebergewebe der entsprechenden Tiere druchgeführt. Die Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese am ABI3130 (Applied Biosytems) unter der Verwendung der 3130 Data Collection v3.0 Software analysiert und ausgewertet. Dabei wurden die DNA Fragmente entsprechend ihrer Länge sortiert und in einem Profil dargestellt, dass es erlaubt, Deletionen oder Insertionen in den amplifizierten Repeats sichtbar zu machen.

Für die MSI Analyse der humanen Gewebsproben wurde die DNA auf zwei etablierte Mononukleotidmarker (BAT25, BAT26) (Deschoolmeester J, 2008) nach dem oben beschriebenen Prinzip getestet.

#### 3.8.2 KRAS Mutationsanalyse und Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung ist eine Methode, die auf einer Nukleotidextension basiert. Wenn eine zu einem bestimmten Zeitpunkt zugegebene Base an ein Template bindet und es zu einer Extension des Primers kommt, wird Pyrophosphat gebildet. Pyrophosphat wird daraufhin in fluoreszente Emission übersetzt, die zu der Menge angelagerter Nukleotide und zur Primerextension proportional ist.

Für den Nachweis einer Punktmutation von *KRAS* in humanem Tumorgewebe wurde zunächst mit dem QiAmp Tissue Kit (Qiagen) DNA aus Paraffinschnitten oder aus Kryoschnitten isoliert. Der Analyse lagen zwei verschiedene Primerkombinationen zugrunde (Poehlmann A, 2007 und Ogino S, 2005; siehe Indikation der Primer im Anhang Methoden). Unter Verwendung eines Primerpaares, von dem der Forward oder der Reverse Primer biotinyliert war, wurde das gewünschte Genfragment des Exon 2 amplifiziert. Der biotinylierte DNA Strang des Produktes wurde mit einem Sequenzierungsprimer durch Pyrosequenzierung analysiert und auf Mutationen untersucht. Zur Pyrosequenzierung wurde der PyroMark Q24 Pyrosequencer (Qiagen) verwendet und die Angaben des Herstellers beachtet. Das Ergebnis wurde mit der PyroMark Q24 1.0.10 Software ausgewertet.

#### 3.8.3 Tp53 Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse von *Tp53* an humanem Gewebe wurde durch PCR und Amplifizierung der Exons 5 - 8 mit den entsprechenden Primern (siehe Anhang) durchgeführt. Die Produkte wurden durch Kapillarelektrophorese am ABI3130 (Applied Biosytems) unter der Verwendung der 3130 Data Collection v3.0 Software analysiert und ausgewertet.

#### 3.8.4 Promotermethylierung von *p16INK* (CDKN2A)

Für die Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus im *CDKN2A* Promoter der humanen Tumoren wurde die Methode der Pyrosequenzierung verwendet (siehe auch KRAS Mutationsanalyse). Zunächst wurde die isolierte DNA durch eine Bisulfidbehandlung (EZ DNA Methylation Gold Kit, Zymo Research, #D5005) konvertiert. Dadurch wird unmethyliertes Cytosin in Uracil konvertiert, methyliertes Cytosin jedoch nicht. Es folgt eine auf einer PCR basierende Amplifizierung (PyroMark Q24 CpG p16 Kit, Qiagen, #970012) des Exon 1 der konvertierten DNA. Durch Pyrosequenzierung (PyroMark Q24 Pyrosequencer, Qiagen) mit dem entsprechenden Sequenzierungsprimer kann so in der konvertierten DNA die Methylierung an einzelnen Cytosinen nachgeweisen werden.

#### 3.9 Anhang Methoden

#### 3.9.1 Verwendete Antikörper:

#### 3.9.1.1 Immunblotanalyse

- α–Akt (Cell Signaling, #9272)
- α–APC (Santa Cruz, #sc-895, N-15)
- $\alpha$ - $\beta$ -Actin (Sigma , #A4700)
- $\alpha$ - $\beta$ -catenin (UBI, #6734)
- α–Cdk2 (Santa Cruz, #sc-163)
- α-Cdk4 (Santa Cruz, #sc-260)
- α–Cyclin D1 (Santa Cruz, #sc-718)

- α–CyclinE (Santa Cruz, #sc-481)
- $\alpha$ -Cytokeratin8/18 (Progen, #GP11)
- $\alpha$ –Erk1/2 (Cell Signaling, #9102)
- $\alpha$ –Jnk (BD Pharmingen, #554286)
- $\alpha$ -Msh2 (Santa Cruz, #sc-22771)
- $\alpha$ -Msh6 (Santa Cruz, #sc-10798)
- $\alpha$ -p15<sup>INK4b</sup> (Cell Signaling, #4822)
- $\alpha$ -p16<sup>ink4a</sup> (Santa Cruz, #sc-1661)
- $\alpha$ -p19<sup>ARF</sup> (Abcam, #ab80-50)  $\alpha$ -p38 (Santa Cruz, #sc-535)
- $\alpha$ -p38 (Santa Cruz, #sc-535)
- $\alpha$ -phospho-Akt (Cell Signaling #9271)
- $\alpha$ -phospho-Erk (Cell Signaling, #9101)
- $\alpha$ -phospho-p38 (Cell Signaling, #9211)
- $\alpha$ -Smooth Muscle-Actin (#614)
- $\alpha$ -Tgf $\beta$ RII (Santa Cruz, #sc-400)
- $\alpha$ -Vimentin (Santa Cruz, #sc-7557-R)

#### 3.9.1.2 Immunohistochemie und Immunfluoreszenz

- $\alpha$ - $\beta$ -catenin (Ventana, #760-4242)
- $\alpha$ - $\beta$ -catenin (UBI, #6734)
- α-BrdU (Amersham Bioscience, #RPN201)
- α-CD3 (BD Pharmingen, #555274)
- a-CD45 (BD Pharmingen, #553089)
- α-Cdx2 (BioGenex, #AM392)
- α-c-Myc (Santa Cruz, #sc-788)
- α-Cytokeratin 20 (Progen, #GP-K20)
- α-Cytokeratin 7 (Progen 16090)
- α-Lysozym (DakoCytomation, #A0099)
- α-Mgmt (Medac, # MS-470-P)
- α–Mgmt (Santa Cruz, #sc-28241)
- α-Mlh-1 (BD Pharmingen, #551091)
- α–Msh2 (Santa Cruz, #sc-22771)
- α-MUC5AC (Neomarker, #MS-145)
- $\alpha$ -p14<sup>Arf</sup> (CytoMed Systems, #Mob456)
- $\alpha$ -p16<sup>INK</sup> (Diagnostic Biosystems, #Mob213)
- $\alpha$ -p53 (NeoMarkers, #MS-186-Po)
- $\alpha$ –p53 (Novocastra, #CM5)
- $\alpha$ -Synaptophysin (DakoCytomation, #A0010)
- $\alpha$ -Tgf $\beta$ RII (Santa Cruz, #sc-400)
- $\alpha$ -Thyroid transcription factor-1 (Dako, #M3575)

#### 3.9.1.3 Sekundäre Antikörper (Westernblot)

 $\alpha$ -Guinea Pig HRP-linked (Chemicon, #AP193P)

 $\alpha$ -mouse IgG HRP-linked (GE Healthcare, #NA9310V)

 $\alpha$ -rabbit IgG HRP-linked (GE Healthcare, #NA9340V)

#### 3.9.1.4 Sekundäre Antikörper (Immunohistochemie und Immunfluoreszenz)

 $\begin{array}{l} \alpha-\text{guinea pig IgG biotinyliert (Vector Laboratories, #BA7000)} \\ \alpha-\text{guinea pig IgG FITC (Molecular Probes, #61-4611)} \\ \alpha-\text{mouse IgG biotinyliert (Vector Laboratories, #BA9200)} \\ \alpha-\text{mouse IgG Fluoreszenz 488nm (Molecular Probes, #A11001)} \\ \alpha-\text{mouse IgG Fluoreszenz 596nm (Molecular Probes, #A21203)} \\ \alpha-\text{rabbit IgG biotinyliert (Vector Laboratories, #BA1000)} \\ \alpha-\text{rabbit IgG Fluoreszenz 488nm (Molecular Probes, #A21206)} \\ \alpha-\text{rabbit IgG Fluoreszenz 596nm (Molecular Probes, #A21206)} \\ \alpha-\text{rabbit IgG Fluoreszenz 596nm (Molecular Probes, #A11034)} \\ \alpha-\text{rat IgG biotinyliert (Vector Laboratories, #BA9400)} \end{array}$ 

RT-PCR Primer	Forward 5'-3'	Reverse 5´-3´
Ascl2	GAAGGTGCAAACGTCCACTTC	CTACGAGTTCTGGTGCGCC
Axin2	CAGAGGTGGTACCTTGCCAAA	GCCGACAGTGCAAGACCC
ChromograninA	AGTCCCCACTGCAGCATCC	CGACTGACCATCATCTTTCTGG
c-Myc	AACTACGCAGCGCCTCCC	ATTTTCGGTTGTTGCTGATCTGT
Cnn3	CCTATGGGACTCGGAGGCA	AATCGTGGTCTGGTCAAAGGG
Cryptdin	CAGCCAGGAGAAGAGGACCAG	TAGCATACCAGATCTCTCAACGATTC
CycliD3	AGTTGCGGGAGTGGGAGGT	TCATCCGCAGACATAGAGCAGG
CyclinD1	CCCTGACACCAATCTCCTCAAC	GCATGGATGGCACAATCTCCT
CyclinE	ATGTGGCCGTGTTTTGCA	GGTCTGATTTTCCGAGGCTGA
Cyclophilin	ATGGTCAACCCCACCGTGT	TTCTGCTGTCTTTGGAACTTTGTC
Dec1	GGCGGGGAATAAAACGGAGCGA	CCTCACGGGCACAAGTCTGGAA
EGF	CTCGCCCGGACGGAGT	GCATCCTGGATAACTATTTCGGTC
Gkn1	CGACAACAATAACGGCTGGG	TGGCATCCTTGTTCATTCTGTG
Gkn2	TGTTTGGGTCGCCTATTCG	TTGTAGCCACCTCACCCTCAT
Math1	AACGGCGCAGGATGCA	CGTTGTTGAAGGACGGGATAA
Mgmt	CGTGCAGTAGGAGGAGCAATC	GAACCACCCTGTGGCAGG
Mlh-1	ATGTATTTCACCCAGACCTTGCTT	AGCCACCCCTGTCGTGG
Muc2	TCGCCCAAGTCGACACTCA	GCAAATAGCCATAGTACAGTTACACAGC
p16lnk4a	CCCAAGGCCCCGAACTC	TGTGAACGTTGCCCATCATC
p19Arf	GCCGCACCGGAATCCT	TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT
p53 F	AGATCCGCGGGCGTAAAC	TCTGTAGCATGGGCATCCTTT
Pla2g2a	GAGAGCTTCTCCATCTGGTGGAT	TTCACGCACAGGAGGCAG
Prox1	CTTCCGCCATCCCTTTCC	AGGCTCTGTCCTTCCCCG
Synaptophysin	TTCGTGAAGGTGCTGCAGTG	TCTCCGGTGTAGCTGCCG
Tff1	CCAGCAGTGCACGGAGAGA	TGGAAGCACCACGGGAAT
Tff2	CAGTGGTCCTGGTTTTGGGA	TCAGCCTGGAGCACCGAC

#### 3.9.2 Verwendete Primer

MSI Analyse		
TG27 (6-FAM)	GGATCACTCGATGTACGGCTACTC	CCAGGCAGGCAAAGCATTTAT
TA27 (6-FAM)	CACCCCTTGCTACCACTAAGAAA	CTCATTGGAGTTTGACCCATCA
GA29 (6-FAM)	CAGGAGGTCAAGGTCATCCTAAG	CCACCATGGTAGGAGCTTGCTA
CT25/CA27 (VIC)	GGAGATTCTGCTGTTTCAAACAAG	TTCCTATACATGGGTGGAGTAGGA
A33 (NED)	TACAGAGGATTGTCCTCTTGGAG	GCTGCTTCACTTGGACATTGGCT
DNA-Affinitäts-Präzipitations-		
TCF-BIO For	CCCTTTGATCTTACCCCCTTTGATCTTAC	2
	GGTAAGATCAAAGGGGGGTAAGATCAAA	
ICF-BIO Rev		
Genotynisierung	5'.3'	
Cre For		
Cre Rev	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	
K-ras For	ATGACCGAGTACAAGCCCAC	
K-ras Rev	GCGTGAGGAAGAGTTCTTGC	
Ink4a/Arf For	GTGATCCCTCTACTTTTCTTCTGACTT	
Ink4a/Arf Rev wt	CGGAACGCAAATATCGCAC	
Ink4a/Arf Rev <b>ko</b>	GAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCA	
p53 For	CACAAAAACAGGTTAAACCCAG	
p53 Rev	AGCACATAGGAGGCAGAGAC	
Mlh-1 For	TGTCAATAGGCTGCCCTAGG	
Min-1 Rev wt	TGGAAGGATTGGAGCTACGG	
KRAS Mutationsanalyse		
Ogino S, 2005		
D361 KRAS-F	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA	
D362 KRAS-R-BIO	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT	
KRAS Pyro S1	TGTGGTAGTTGGAGCT	
Poehlmann A, 2007		
D364 KRAS-F-BIO	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG	
D365 KRAS-R	TCGTCCACAAAATGATTCTGA	
KRAS Pyro S2	GCACTCTTGCCTACG	
p53 Mutationsanalyse		
P53 EX5 Uni	GTAAAACGACGGCCAGT	GCTTTATCTGTTCACTTGTGCCCT
P53 EX5 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	GGGACCCTGGGCAACC
P53 EX6 Uni	GTAAAACGACGGCCAGT	CAGGGCTGGTTGCCCA
P53 EX6 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	AAAGCCCCCCTACTGCTCAC
P53 EX7 Uni	GTAAAACGACGGCCAGT	TTGCCACAGGTCTCCCCA
P53 EX7 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	GTATGGAAGAAATCGGTAAGAGGTG
P53 EX8 UNI	GTAAAACGACGGCCAGT	TCCTTACTGCCTCTTGCTTCTCTT
P53 EX8 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	CATAACTGCACCCTTGGTCTCC

### 4. Ergebnisse

# 4.1 Aktivierung von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> führt zu einer Hyperproliferation von Enterozyten im Jejunum

Die Aktivierung von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> ist eine der zentralen Faktoren für die intestinale Tumorgenese. Um zu ermitteln, welchen Effekt die K-ras<sup>G12D</sup>-Expression auf den Dünndarm der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse hat, wurden LSL-K-ras<sup>G12D</sup>-Mäuse mit der Villin-Cre Maus gekreuzt. Die daraus resultierenden K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse, die auf endogener Ebene onkogenes K-ras<sup>G12D</sup> in Enterozyten des gesamten Darmes exprimierten, wurden mit der nach Mendel zu erwartenden Wahrscheinlichkeit geboren. Eine regelmäßige Gewichtskontrolle der Tiere über einen Zeitraum von 12 Monaten ergab zwischen den Geschlechtern und im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen signifikanten Unterschied und die Tiere mit K-ras<sup>G12D</sup>-Expression zeigten keinerlei Defekte in der Entwicklung. Für histologische Analysen wurde der gesamte Darm von K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren verschiedenen Alters (12 bis 68 Wochen) entnommen. Das Jejunum wurde als repräsentativer Abschnitt des Dünndarmes untersucht. Bei der makroskopischen Betrachtung des Dünndarmes von K-ras<sup>G12D</sup>-Mäusen fielen eine longitudinale Verlängerung (Abb. 1 A; 36,9±0,6: 43,6±1,5) sowie eine Verdickung der Mukosa im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. An H&E gefärbten Paraffinschnitten von Darmrollen des Jejunum dieser Mäuse war ein sogenanntes "Branching" der Villi (Abb. 1 D, E) und eine horizontale Duplikation der Krypten, sogenannte "Crypt fission", zu erkennen (Abb. 1 F). Neben der Verlängerung in der longitudinalen Ebene kam es zur Elongation in der horizontalen Ebene.



Abb. 1| K-ras<sup>G12D</sup>-Expression führt zu einer Hyperproliferation im Dünndarm und zu einer erhöhten Migrationsrate von Enterozyten. (Weiße Balken = LSL-K-ras<sup>G12D</sup>, schwarze Balken = K-ras<sup>G12Dint</sup>). (A) Länge des Dünndarms in cm in Kontrolltieren (n=30) und K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen (n=15). (B) Länge der Villi ausgedrückt in Zellen pro Villus und Proliferationsindex der Krypten (C) in 16 Wochen alten Tieren (n= jeweils 5 pro Genotyp); Fehlerbalken im t-Test: \*\*\* <0,001, \*\* <0,05). (D-F) H&E-Färbungen mit *Branching* der Krypten (E) und *Crypt Fission* (F) in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus. (G) Migrationsrate von Enterozyten des Jejunums nach 1,5h und 48h zeigt eine schnellere Migration in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus (schwarze Linie, n= jeweils 3 Mäuse á 15 Krypten). (H,I) H&E-Färbung eines Tumors mit serratierter Histologie aus dem Duodenum einer K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus.

Eine an den H&E gefärbten Paraffinschnitten vorgenommene Auszählung der Anzahl von Epithelzellen pro Krypten-Villus-Einheit bestätigte eine signifikant höhere Enterozytenzahl pro Villus in *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Tieren (113,06±5,87: 81,31±2,1; Abb. 1 B). Um zu ermitteln, ob die Expression von onkogenem *K-ras*<sup>G12D</sup> in den Enterozyten des Dünndarmes eine Hyperproliferation induziert, wurde von  $\alpha$ -BrdU gefärbten Paraffinschnitten der Proliferationsindex bestimmt. Durch die Auszählung der BrdU–positiven Zellen in den Krypten des Jejunum wurde eine signifikante Hyperproliferation der Enterozyten festgestellt (11,1±0,34: 14,6±0,56) (Abb. 1 C). Darüber hinaus fand sich eine erhöhte Migrationsrate von Enterozyten im Dünndarm der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäuse. Dies ergab sich aus der Analyse des Jejunums von 12 Wochen alten Mäusen, bei denen eine BrdU-Injektion 1,5 Stunden, 24 Stunden oder 48 Stunden zurücklag. In α-BrdU gefärbten Schnitten wurde die Anzahl und Position von positiven Zellen innerhalb des Villus bestimmt. Anhand dieser Analyse wurde im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren eine schnellere Migration der Epithelzellen entlang der Villi von *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen ermittelt (Abb. 1 G).

Die Überexpression von onkogenem K-ras<sup>G12V</sup> in Enterozyten eines transgenen Mausmodells führte bei Tieren ab dem Alter von 2 Monaten in über 80% der Tiere zur Bildung von *Aberrant Crypt Foci* (ACF) und Adenokarzinomen, die zu 93% im Dünndarm lokalisiert waren (Janssen et al., 2002). Zur Ermittlung der Tumorinzidenz im Dünndarm der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäuse, die das Onkogen vom endogenen Promoter exprimierten, wurden die Tiere bis zu einem Alter von 68 Wochen beobachtet. Ab einem Alter von 36 Wochen bildeten sich in *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen in 25% der Fälle (7/28) einzelne Adenome mit einer serratierten Morphologie im Duodenum oder Jejunum (Tabelle 1 im Anhang) (Abb. 1 H, I), jedoch keine invasiven Karzinome.

# 4.2 Expression von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> führt zur Bildung von hyperplastischen Polypen mit einem serratierten Phänotyp im Kolon von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen

In der humanen Kolontumorgenese ist onkogenes *KRAS* als Schlüsselmutation im Zusammenhang mit der Initiierung der alternativen serratierten Karzinogenese beschrieben worden (Noffsinger, 2009; Wynter et al., 2004). Um festzustellen, ob die Expression von *K-ras*<sup>G12D</sup> im Kolon von Mäusen eine serratierte Tumorgenese induziert, wurde das Gewebe der Mäuse analysiert. Im Kolon von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen wurde nach Messung des Organes im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Verlängerung festgestellt (Abb. 2 A;  $8,1\pm0,17$ :  $10\pm0,37$ ). Ebenfalls auffallend war eine Verdickung der Mukosa der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse, die anhand einer Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) *in vivo* (Abb. 2 B, C) festgestellt werden konnte. Auch eine Methylenblau-Färbung des der Länge nach aufgeschnittenen Kolons zeigte eine hyperplastische Oberfläche des Epithels (Abb. 2 D, E). Darüber

hinaus fiel bei H&E gefärbten Paraffinschnitten eine erhöhte Ausprägung der proximalen Falten im Kolon von *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen auf (Abb. 2 F, G). Daneben kam es zur Ausbildung von Villus-ähnlichen Strukturen im Kolonepithel, die sich über die gesamte Länge des Kolons erstreckten (Abb. 2 H, I). Die Krypten im Kolon der Kras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse erschienen deutlich tiefer und waren durch apikale Verzweigungen gekennzeichnet (Abb. 2 I). Um festzustellen, ob die Tiefe der Krypten auf einer erhöhten Anzahl von Epihelzellen basierte, wurde eine Zählung der Epithelzellen pro Krypte durchgeführt. Im Mittel von 20 ausgewerteten vollen Krypten pro Tier fanden sich wie erwartet in einer Krypte einer K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus signifikant mehr Epithelzellen als in einer Kontrollmaus (55,66±1,14: 41,46±4,43; Abb. 2 J). Da in anderen Arbeiten bereits eine durch die Expression von K-ras<sup>G12D</sup> bedingte epitheliale Hyperproliferation im Kolon von Mäusen beschrieben wurde, (Haigis et al., 2008; Trobridge et al., 2009) und die Proliferationsrate im Dünndarm der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse erhöht war, wurde der Proliferationsindex im Kolon bestimmt. Für diesen wurden 16 Wochen alte Mäuse mit BrdU injiziert und eine Zweck immunohistochemische  $\alpha$ -BrdU-Färbung an Paraffinschnitten des Gewebes durchgeführt. Der Index wurde durch Auszählung der BrdU-positiven Zellen in den Krypten des Kolon bestimmt und ließ in den K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikante Hyperproliferation der Enterozyten erkennen (Abb. 2 K). Parallel dazu wurden die mRNAs, die für die zellzyklusregulierenden Gene kodieren quantitativ durch eine RT-PCR analysiert. In den *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen waren die mRNAs von CyclinE, CyclinD1, CyclinD2 und CyclinD3 im Vergleich zu der Kontroll-RNA nicht signifikant reguliert (Abb. 2 L).



Abb. 2 Expression von K-ras<sup>G12Dint</sup> führt zur Bildung von hyperplastischen Polypen im Kolon, nicht jedoch zu einer Hyperproliferation. (Weiße Balken = LSL-K-ras<sup>G12D</sup>, schwarze Balken = K-ras<sup>G12Dint</sup>). (A) Länge des Kolons in cm in Kontrolltieren (n=30) und der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus (n=15) (Fehlerbalken: \*\*\* <0,001 im t-Test); (B,C) Dicke der Mukosa gezeigt durch MRT in einer LSL-K-ras<sup>G12D</sup>-Maus (B) und einer K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus (C). (D,E) Methylenblaufärbung der Mukosa zeigt eine unregelmässige Oberfläche des Epithels der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus. (F-I) Eine H&E-Färbung lässt eine Ausprägung der proximalen Kolonfalten in einer K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus erkennen (G) und zeigt eine Kryptenhyperplasie im Kolon der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus (I). (J) Erhöhte Anzahl der Zellen pro Krypte in 16 Wochen alten K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen, aber keine Hyperproliferation (K) (n= jeweils 5 pro Genotyp; Fehlerbalken im t-Test: \*\* <0,05 und n.s: nicht signifikant. (L) RT-PCR und relative Menge der mRNA von Proilferations- bzw. Zellzyklusmarkern in Kolonepithelzellen von LSL-K-ras<sup>G12D</sup> - und K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen.

Die hyperplastischen Krypten im Kolon der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus hatten große Ähnlichkeit mit humanen, serratierten hyperplastischen Polypen (HP), die über eine alternative Route der Tumorgenese entstehen und sich durch eine serratierte Morphologie auszeichnen (Makinen, 2007). Für einen direkten Vergleich von HP mit der hyperplastischen Mukosa des Kolons der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäuse wurden H&E-Färbungen der beiden Gewebe miteinander verglichen. Dadurch war eine Übereinstimmung der serratierten Histologie der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus mit den humanen Polypen deutlich zu erkennen (Abb. 3 A-D). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wird in dieser Arbeit im weiteren Verlauf für den histologischen Phänotyp des Kolon der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus die Bezeichnung "murine serratierte Hyperplasie" (mSH) verwendet.



Abb. 3 Vergleich von Kryptenhyperplasie der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus und eines humanen serratierten Polypen. H&E-Färbungen in der Übersicht (A,B) und im Detail (C,D) zeigen deutliche Übereinstimmungen.

In einem Mausmodell mit transgener *Villin*-Cre vermittelter Überexpression von Kras<sup>G12V</sup> zeigte sich ab einem Alter von neun Monaten die Bildung von einzelnen Adenomen im Kolon (Janssen et al., 2002). Um festzustellen, ob onkogenes Kras<sup>G12D</sup> eine Tumorprogression im Kolon von *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen bewirken kann, wurden die Mäuse bis zu einem Alter von 68 Wochen kontrolliert. Bei keiner der 28 sezierten Mäuse im Alter von 36 bis 68 Wochen fanden sich Adenome im Kolon (Tabelle 1, Anhang Ergebnisse), was darauf hindeutet, dass onkogene *K-ras<sup>G12D</sup>*-Expression im Kolon alleine nicht ausreicht, um eine Tumorprogression zu vermitteln.

### 4.3 Induktion der Expression von K-ras<sup>G12D</sup> im adulten Tier führt zu der Bildung von hyperplastischen Polypen im Kolon

Die Expression von Villin im Darm beginnt im Embryo bereits ab Tag 12.5 (Madison et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass K-ras auf die Entwicklung von Mäusen einen Einfluss hat (Johnson et al., 1997). Um auszuschließen, dass der beschriebene intestinale Phänotyp in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus auf eine Expression von onkogenem K-ras im Embryo bedingt war, wurden die Mäuse mit einer Villin-Cre<sup>ERT2</sup> Maus gekreuzt (el Marjou et al., 2004). So konnte im adulten Stadium die Expression von onkogenem K-ras durch orale Gabe von Tamoxifen induziert werden. Bereits an Tag 8 (drei Tage nach der letzten Gabe von Tamoxifen) kam es wie bei den Kras<sup>G12Dint</sup> -Mäusen im Kolon der Cre<sup>ERT2</sup>-K-ras<sup>G12Dint</sup> -Mäuse zu einer Ausbildung von mSH, nach 21 Tagen (Abb. 4 A,B) sind die Krypten phänotypisch nicht mehr von denen der K-ras<sup>G12Dint</sup> - Maus zu unterscheiden. Darüber hinaus ist an Tag 6 eine Hyperproliferation der Kolonepithelzellen in den induzierten Cre<sup>ERT2</sup>-K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen zunächst erkennbar (Abb. 4 C), die nach 21 Tagen jedoch zur der mit Kontrollmäusen vergleichbaren Proliferationsrate reduziert ist (Abb. 4 D).



Abb. 4 Induktion der Expression von Kras<sup>G12D</sup> im adulten Tier führt zu einer Kryptenhyperplasie im Kolon. (A,B) H&E-Färbung des Kolons 21 Tage nach Tamoxifen-Induktion zeigt eine Hyperplasie des Kolonepithels in der *CreER<sup>T2</sup>/LSL-K-ras<sup>G12D</sup>*-Maus (**B**). Villin-(C) Tamoxifen-induzierte K-ras<sup>G12D</sup>-Expression nach 6 Tagen zu einer Hyperproliferation im Kolonepithel der *Villin-CreER*<sup>T2</sup>/*LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>-Maus (schwarze Balken), die nach 21 Tagen (D) nicht mehr präsent ist (Fehlerbalken:\* 0,05; n.s.: nicht signifikant).



### 4.4 Onkogene K-ras-Expression führt zur selektiven Aktivierung von Erk in Enterozyten des Kolons

Der Raf-Mek-Erk-Signalweg hat in der Tumorgenese eine besondere Relevanz, da die Aktivierung zur Induktion von Proliferation führt. Mutationen im *KRAS* Onkogen führen zur Induktion der MAPK-Kaskade über Raf1 (Moodie et al., 1993) oder zur Aktivierung von Akt über Pi3Kinase (Rodriguez-Viciana et al., 1994). Aktivierung von p38 Kinase und Jnk wurde daneben in einem Mausmodell für K-ras-vermittelte Lungenkarzinogenese beschrieben (Lee et al., 2002).

Um eine Involvierung der von Ras-Aktivierung betroffenen *Downstream*-Signalwege in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus zu bestimmen wurde in Proteinlysaten aus isolierten Enterozyten des Kolons zunächst die Aktivierung von K-ras durch einen Ras-GTP *Pulldown* Assay bestätigt. Verglichen mit Kontrollmäusen ist in Enterozyten dieser Mäuse eine deutliche Anreicherung von aktivem Ras-GTP zu erkennen (Abb. 5 A). Durch einen Westernblot bestätigt führte diese Aktivierung zu einer selektiven Phosphorylierung von Erk1/2, ohne dass die basale Proteinexpression von Erk1/2 erhöht war (Abb. 5 B). Andere *Downstream*-Ziele wie Ral oder PI3K/Akt waren jedoch nicht reguliert, wie bei dem Westernblot gegen p-Akt und einem Ral-GTP *Pulldown* Assay gezeigt werden konnte (Abb. 5 C,D). Weitere MAP-Kinasen wurden, wie der Westernblot gegen p-p38 Kinase und ein JNK Kinase Assay zeigen, durch die K-ras<sup>G12D</sup>-Expression ebenfalls nicht aktiviert (Abb. 5 E,F).



Abb. 5 Expression von K-ras<sup>G12D</sup> führt zur spezifischen Aktivierung von Erk im Kolon. (A) GTP-Ras *Pulldown* Assay bestätigt K-ras-Aktivierung in Enterozyten der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus. (B) Westernblot zeigt Aktivierung von p-Erk in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus, jedoch nicht von p-Akt (C) und pp38 (E). (D) Ein GTP-Ral *Pulldown* Assay und ein Jnk Kinase Assay (F) zeigen keine Aktivierung beim Vergleich der *LSL-K-ras*<sup>G12D</sup> mit der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus.

### 4.5 Die Aktivierung der Ras-Raf-Mek-Erk-Signalkaskade in der *Kras*<sup>G12Dint</sup>-Maus führt zu einer p16<sup>lnk4a</sup>-abhängigen OIS im Kolon

Eine Aktivierung der Raf-Mek-Erk-Kaskade als Folge einer Aktivierung von onkogenem Ras ist einer der Hauptinitiatoren von Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) (Mooi and Peeper, 2006). Bereits in anderen Organen konnte *in vivo* eine Seneszenz als Mechanismus zur Hemmung des Tumorwachstums bestätigt werden (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Um zu testen, ob es im Kolon von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen zu einer Induktion von Seneszenz kommt, die zur Hemmung des Tumorwachstums führt, wurde zunächst eine Färbung für die enzymatische Aktivität von *Seneszenz-associated-(SA)-β-Galaktosidase,* einem Indikator von OIS (Dimri et al., 1995), durchgeführt. Tatsächlich konnte in den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche Anreicherung von SA-β-Galaktosidase in Enterozyten detektiert werden, die auf OIS in den mSH hindeutet (Abb. 6 A,B).

Abb. 6 Expression von K-ras<sup>G12D</sup> führt p16<sup>Ink4a</sup> zur vermittelten OIS im Kolon. (A,B) SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung an Krvoschnitten zeiat OIS in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus. (C) RT-PCR Daten zeigen eine Induktion der Seneszenzmarker p16<sup>lnk4a</sup> und Dec1, nicht aber von p19Arf (Weiße und p53 Balken LSL-K-= ras<sup>G12D</sup> schwarze Balken = K-ras<sup>G12Dint</sup>). Westernblot-(D) Analyse von Epithelzelllysaten zeigt spezifische eine Induktion von p16<sup>lnk4a</sup> nicht jedoch von p19<sup>Arf</sup> oder p15<sup>lnk4b</sup> in der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus.



Der Ink4a/Arf-Lokus kodiert für die Zellzyklusinhibitoren p16<sup>lnk4a</sup> und p19<sup>Arf</sup> und hat eine wichtige Funktion bei der Induktion von Seneszenz (Collins and Sedivy, 2003). Vor allem zwei Signalwege können in die Induktion von Seneszenz involviert sein. Zum einen ist es der p16<sup>lnk4a</sup>-Rb Signalweg, zum anderen der p19<sup>Arf</sup>-p53 Signalweg. Um festzustellen, entlang welcher Signalkaskade die Seneszenz in den Kolonenterozyten der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse induziert wurde, wurde eine quantitative Bestimmung von mRNA und Proteinen in Enterozyten des Kolons durchgeführt. Hier konnte eine deutlich verstärkte Expression von p16<sup>Ink4a</sup>, sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 6 C, D). Die mRNA eines zweiten Seneszenzmarkers, Dec1 (Collado and Serrano, 2005), war ebenfalls in den K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen hochreguliert (Abb. 6 C). Dagegen zeigte weder die mRNA-Expression von 19<sup>Arf</sup>, noch von p15<sup>Ink4b</sup> oder p53 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 6 C,D). Die Induktion von Seneszenz und die erhöhte Expression von p16<sup>lnk4a</sup> konnten ebenfalls in den Villin-Cre<sup>ERT2</sup>-K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen nach 21 Tagen der ersten Tamoxifengabe bestätigt werden (nicht abgebildet), was im Einklang zur zu diesem Zeitpunkt bereits reduzierten Proliferationsrate steht (vgl. Abb. 4 D).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Involvierung des p16-Rb Signalweges, nicht jedoch des p19-p53 Signalweges im Hinblick auf OIS im Kolon der Mäuse hin. Um die Funktion des p19<sup>Arf</sup>-p53 Signalweges bei der OIS in den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse *in vivo* zu beurteilen, wurden *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse mit  $p53'^{-}$ -Mäusen (Jonkers et al., 2001) gekreuzt. In den resultierenden *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/p53'-Tieren, kam es neben der Aktivierung von onkogenem K-ras zur Enterozyten-spezifischen Deletion von *p53*. Diese Tiere wurden bis zu einem Alter von 52 Wochen auf die Entstehung von Adenomen kontolliert. Die für die *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse charakteristische mSH waren auch in diesen Mäusen im Kolon zu finden. Weiter fortgeschrittene Adenome jedoch wurden bei keiner der untersuchten Mäuse im Kolon gefunden (Tabelle 1, Anhang).



Abb. 7 Onkogenes K-ras führt zur spezifischen Aktivierung von Erk, aber nicht zu einer OIS im Dünndarm. (A) GTP-Ras *Pulldown* Assay bestätigt K-ras-Aktivierung in Enterozyten der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus. (B) Westernblot zeigt Aktivierung von p-Erk in der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus, jedoch nicht von p-Akt (C) und p-p38 (E). (D) Ein GTP-Ral *Pulldown* Assay und ein Jnk Kinase Assay (F) zeigen keine Aktivierung in der *LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>-Maus im Vergleich zu der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus. (G,H) Anhand einer SA-β-Galaktosidase Färbung ist keine OIS in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus festzustellen. (I) RT-PCR Daten zeigen keine Regulation der relativen Menge an mRNA der Seneszenzmarker p16<sup>lnk4a</sup> und Dec1 oder p19<sup>Arf</sup> und p53 in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus in Epithelzellen des Jejunums (Weiße Balken = *LSL-K-ras*<sup>G12D</sup>, schwarze Balken = *K-ras*<sup>G12Dint</sup>).

### 4.6 Onkogenes K-ras führt zur selektiven Aktivierung von Erk in Enterozyten des Jejunums, jedoch nicht zu einer OIS

Da es im Gegensatz zum Kolon im Dünndarm der Mäuse durch Aktivierung von Kras<sup>G12D</sup> zu einer Hyperproliferation und in 25% der Fälle zur Bildung von Adenomen kommt, wurde ebenfalls die Aktivierung von Signalwegen in Enterozyten des Jejunum überprüft. Im Dünndarm von *K-ras<sup>G12Dint</sup>* - und *Villin-Cre<sup>ERT2</sup>/K-ras<sup>G12Dint</sup>* -Mäusen wurde in einer Westernblot-Analyse ebenfalls eine selektive Aktivierung von p-Erk in Enterozyten als Folge der durch einen GTP-Ras *Pulldowm* Assay bestätigten K-ras-Aktivierung festgestellt (Abb. 7 A, B). Andere *Downstream*-Signalwege waren - im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Kolon - im Jejunum nicht aktiviert. Die p-Akt und p-p38 Westernblots, sowie der GTP-Ral *Pulldown* Assay und der JNK Kinase Assay zeigten keine signifikanten Regulierungen in den Epithelzellen des Jejunums der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus (Abb. 7 C-F). Darüber hinaus konnten trotz der Induktion von p-Erk, im Jejunum keine Anzeichen einer OIS, weder durch die SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung (Abb. 7 G, H) noch durch die quantitative Bestimmung der mRNA von p16<sup>lnk4a</sup>, Dec1, p19<sup>Arf</sup> und p53 (Abb. 7 I) gefunden werden.

Eine Funktion des Tumorsupressors p53 in Bezug auf die Tumorinzidenz im Jejunum der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus wurde durch die Analyse der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/p53<sup>-/-</sup>*-Tiere sichtbar. Im Dünndarm bildeten sich in 33% (4/12) der Tiere bereits ab einem Alter von 24 Wochen einzelne Tumoren. In 1 von 6 Fällen kam es zur Bildung eines invasiven Karzinoms (Tabelle 1, Anhang).

# 4.7 Deletion von *Ink4a/Arf* in der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus führt zu einer Hyperproliferation und Tumorprogression im Kolon

Für eine funktionelle Bestätigung, dass OIS im Zusammenhang mit dem Ink4a/Arf-Lokus für die gehemmte Tumorprogression im Kolon der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäuse verantwortlich ist, wurden diese Tiere mit Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen (Serrano et al., 1996) gekreuzt. Die daraus resultierenden Mäuse wurden K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> genannt und weisen eine enterozytenspezifische Expression von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> und eine den ganzen Oranismus betreffende Deletion von Ink4a/Arf auf. Anhand von H&E gefärbten Paraffinschnitten des Kolons dieser Mäuse konnte eine stärker ausgeprägte Formation von mSH und Verzweigung der Villi erkannt werden. Die Tiefe der poximalen Falten im Kolonepithel war ebenfalls deutlicher ausgeprägt als in den K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen (Abb. 8 B). Wie erwartet führte die zusätzliche Deletion von Ink4a/Arf in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus zu einer Hyperproliferation im Kolon (Abb. 8 A). In diesen Tieren wurde außerdem die Entstehung von proximal lokalisierten, höher entwickelten Tumoren mit einer serratierten Morphologie observiert (Abb. 8 C). Insgesamt hatten von den begutachteten Mäuse in einem Alter von 5-13 Wochen 53% (17/32) der Tiere einzelne fortgeschrittene Adenome (4/17) und sogar invasive Karzinome (13/17; Abb. 9), die bis auf einen Tumor, der im Ileozökalen Bereich lokalisiert war, im proximalen Kolon auftraten (Tabelle 1, Anhang Ergebnisse). Durch die SA-B-Galaktosidase-Färbung an Kolongewebe wurde bestätigt, dass das beobachtete Tumorwachstum in K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen auf die von Ink4a/Arf-Deletion bedingte Aufhebung der OIS zurückzuführen ist. Im Kolonepithel der K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse und in den serratierten Adenomen im proximalen Kolon konnte keine Färbung von SA-β-Galaktosidase ermittelt werden (Abb. 8 D).

Ergebnisse

Die proliferative Zone in den serratierten Tumoren war zwar expandiert, jedoch auf die basale Hälfte der Krypten begrenzt, was in einer  $\alpha$ -BrdU-Färbung der Adenome zu erkennen war (Abb. 8 E). Alle Tumoren wiesen zusätzlich eine starke Expression des Markers Muc5 auf (Abb. 8 F), welches normalerweise von Zellen in der Magenschleimhaut produziert wird. Die serratierten Adenome zeichneten sich weiter durch Infiltrationen von inflammatorischen Zellen im Tumorgewebe aus, was durch eine Immunfluorenszenz gegen den T-Zell Marker CD3 und einen Marker für differenzierte hämatopoietische Zellen, CD45, ersichtlich war (Abb. 8 G, H). Weiterhin wurden CyclinD1-positive Kerne in den Tumorzellen festgestellt (Abb. 8 I). Eine  $\alpha$ - $\beta$ -catenin-Färbung am Tumorgewebe zeigte eine membranständige Lokalisation des Proteins und keine nukleäre Färbung (Abb. 8 J). Damit im Einklang war die Expression des  $\beta$ -catenin Zielgens c-Myc auf wenige Kerne beschränkt (Abb. 8 K).

# 4.8 *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-*Mäuse entwickeln invasive Karzinome im Kolon und Lungenmetastasen

Neben den serratierten Adenomen wurden in den sezierten Tieren auch invasive Karzinome observiert (13/17) (Abb. 9 A-F). Eine H&E-Färbung der Tumoren ließ einen undifferenzierten Phänotyp erkennen und zeigte deutlich die Invasion durch die Muscularis mukosae (Abb. 9 A,B) Die invasiven Karzinome waren außerdem gekennzeichnet durch eine hohe Proliferationsrate, wie in der Färbung mit  $\alpha$ -Brdu ersichtlich war (Abb. 9 C). Die epitheliale Herkunft der invasiven Zellen wurde durch eine Färbung mit  $\alpha$ -CK8/18 bestätigt (Abb. 9 D). Um eine mögliche epithelialmesenchymale-Transition (EMT) in den invasiven Karzinomen nachzuweisen, wurde eine Doppelfärbung gegen den Epithelzellmarker Ck8/18 und gegen einen Marker von glatten Muskelzellen, α-Smooth-Muscle-Actin, angefertigt. In der Invasiven Zone konnte eine Ko-Färbung der beiden Marker gesehen werden (Abb. 9 E). Manche der beobachteten K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse zeigten bereits ab einem Alter von 5 Wochen die ersten Zeichen einer Krankheit und teilweise Atemnot. In 76 % der Mäuse (8/13) mit Karzinomen wurden außerdem Lungenmetastasen gefunden (Abb. 10), deren epitheliale Herkunft mit einer Färbung gegen den Kolonepithelzellmarker CK20 bestätigt werden konnte (Abb. 10 F). Neben CK20 war auch CK7 in den Metastasen exprimiert (Abb. 10 F). Ein Verlust von Tgf $\beta$ RII, welcher mit proximal lokalisierten, mukosreichen invasiven Kolonkarzinomen in Verbindung stehen kann



(Grady and Markowitz, 2002), konnte durch immunohistochemische Färbungen in den Karzinomen und den Metastasen nicht bestätigt werden (Abb. 9 G, Abb. 10 G).

Abb. 8 Zusätzliche Deletion von *Ink4a/Arf<sup>/-</sup>* in *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen führt zur Induktion von Hyperproliferation und der Bildung von Adenomen im Kolon. (A) Proliferationsindex der Krypten im Kolon von *LSL-K-ras*<sup>G12D</sup> (Weißer Balken) und *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen (schwarzer Balken) (Fehlerbalken: \*\*\*<0,001, t-Test). (B) H&E-Färbung und Ausprägung der proximalen Falten im Kolon und Bildung von serratierten Adenomen (C) im proximalen Kolon . (D) SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung in Adenomen ist negativ. Immunohistochemische Färbungen von BrdU (E), MUC5AC (F), Cyclin D1 (I) und c-Myc (K) und Immunfluoreszenz von CD3 (G), CD45 (H) und  $\beta$ -Catenin (J).

In einigen Tieren fanden sich primäre Lungentumore (Abb. 10 A), die morphologisch deutlich von den Metastasen zu unterscheiden waren und eine starke für Lungenadenome spezifische TTF1 Färbung aufwiesen (Abb. 10 C, D). Darüber hinaus waren die primären Adenome negativ für CK7 und CK20 (Abb. 10 E, F). Eine

Rekombination von *K-ras* in diesen primären Adenomen der Lunge konnte durch eine PCR mit Gewebe der Lungentumore nachgewiesen werden und bestätigte die Aktivierung von onkogenem K-ras in der Lunge (Daten nicht gezeigt). Durch das Wachstum von primären Lungentumoren kann die Tumorinzidenz von 53% in den Mäusen bis zu einem Alter von höchstens 13 Wochen erklärt werden, da spätestens ab diesem Alter die Tiere an solchen Adenomem litten und aufgrund von Atemnot getötet werden mussten. Neben den Lungenadenomen konnte in zwei *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*Tieren ein Karzinom im Ösophagus festgestellt werden.

Aufgrund der Relevanz der Involvierung des Wnt-Signalweges in der klassischen kolorektalen Karzinogenese wurde Tumor-DNA durch Laser Capture Microdissection (LCM) isoliert, um eine  $\beta$ -catenin Mutationsanalyse im Exon 3 des Gens durchzuführen. Im Einklang mit einer membranständigen Lokalisation von  $\beta$ -catenin war in allen 5 getesteten Tumoren keine Mutation von  $\beta$ -catenin zu finden. Der Tumorsuppressor p53 ist in der klassischen Tumorgenese in invasiven Karzinomen häufig mutiert (Greenblatt et al., 1994). Interessanterweise konnte durch immunohistologische Färbungen der Karzinome von K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen eine erhöhte nukleäre Akkumulation von p53 gezeigt werden (Abb. 9 F), was auf eine Mutation hinweisen könnte. Eine Mutationsanalyse der Exons 5-8 von p53 von Tumorgewebe, welches mit LCM isoliert wurde, zeigte jedoch in keinem der Karzinome eine Mutation. Um zu ermitteln, ob die gesteigerte Expression von p53 eine Kompensation des Verlustes der p16<sup>ink4a</sup>-RB abhängigen OIS in Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup> Mäusen bedeutet und das Tumorwachstum hemmt, wurden diese Tiere mit p53<sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt, um K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Tiere zu erhalten. Diese Tiere zeigten bis zu einem Alter von 12 Wochen keine Beschleunigung des Tumorwachstums oder eine erhöhte Tumorinzidenz (Tabelle 1).



**Abb. 9** *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse entwickeln invasive Kolonkarzinome (A) H&E-Färbung eines Karzinoms und (B) Ausschnitt der Invasionsfront. (C) Immunohistochemie von BrdU, des Epithelzellmarkers Ck8/18 (D), p53 (F) und *TgfβRII* (G). (E) Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen Smooth Muscle Actin (rot) und Ck8/18 (grün) zeigt eine EMT in der invasiven Zone.



Abb. 10 *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse entwickeln Lungenmetastasen. Lungentumore in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus. (A) H&E-Färbung eines primären Lungenadenoms und einer Metastase (B). (C,D) Die TTF1 Färbung ist positiv im primären Lungenadenom und negativ in der Metastase. (E,F) Bestimmung der Herkunft der Zellen in einem primären Adenom durch negative CK7/CK20 Färbung (E) und in der Metastase durch positive CK7/CK20 Färbung (F). (G) Die Metastase zeigt Expression von TgfβRII.

Eine Involvierung des Tgf $\beta$ -Signalweges, insbesondere eine Inaktivierung des Tgf $\beta$ RII, in proximal lokalisierten Kolonkarzinomen, ist sowohl in der humanen Karzinogenese relevant, als auch im Zusammenhang mit einer *K-ras*<sup>G12D</sup>-Mutation in der Maus beschrieben worden (Trobridge et al., 2009). Humane Daten deuten vornehmlich auf Mutationen in den Exons 5, 6 und 7 des Gens hin (Grady et al., 1999), und sind vor allem mit MSI-H Tumoren und proximaler Lokalisation assoziiert. In der Mutationsanalyse der Exons 5, 6 und 7 von 6 Tumoren der *K*-

*ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Mäuse wurden für jedes Exon des jeweiligen Tumors 2 bis 4 unabhängige Proben sequenziert. In einem der Tumoren wurde je eine Mutation in Exon 5 und Exon 6 gefunden, die im ersten Fall zu Prolin anstatt Serin und im zweiten Fall zu Serin anstatt Prolin führte. In einem weiteren Tumor wurde in Exon 7 im zweiten Codon eine *Frameshift*-Mutation gefunden. Alle Proben der anderen Tumoren wiesen keine Mutation auf.

# 4.9 Die serratierten Karzinome der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse* sind CIMP-negativ und MSS/MSI-L

Karzinome, die entlang des alternativen, serratierten Weges entstehen sind häufig durch eine DNA-Hypermethylierung (CIMP) und eine MSI gekennzeichnet (Makinen, 2007). Serratierte Adenome mit einer KRAS Mutation sind eher mit CIMP negativ oder CIMP-L assoziiert und sind MSI-L oder MSS, wohingegen serratierte Adenome mit einer BRAF Mutation mit einer CIMP-H und einer MSI-H einhergehen (Wynter et al., 2004). Um den CIMP-Status in den Karzinomen der K-ras<sup>G12Dint</sup>/p16<sup>Ink4a</sup>/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse zu bestimmen, wurde eine MeDip Chip-Analyse druchgeführt (Firma Nimblegene, Berlin). Die DNA von fünf verschiedenen Tumoren wurde hierfür gesammelt, einem Restriktionsverdau unterzogen und mit der ebenso behandelten DNA von Wildtyp und Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mukosa aus dem proximalen Kolon verglichen. Mit dem Methyl-Binding-Domain-2 Protein (MBD) wurden dann anhand einer Immunpräzipitation methylierte Fragmente angereichert und auf einem NimbleGen 385K MM8 RefSeq Promoter Array hybridisiert. Insgesamt waren in beiden verglichenen Gruppen 1172 gemeinsame Gene methyliert, die tatsächliche Anzahl von methylierten Genen war in der Kontroll DNA höher als in der Tumor DNA der Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse (Abb. 11 A). Die klassischen CIMP-Marker Mint1, Mint2, Mint31 und Mlh-1 und die erst kürzlich beschriebenen neuen CIMP-Marker Igf2, Cacna1g, Neurog1, Runx3, Socs1 (Weisenberger et al., 2006) waren in keiner der beiden Proben von einer Methylierung betroffen.



**Abb. 11**| *K-ras*<sup>G12D</sup>/*lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>**Tumoren sind CIMP-negativ und MSS. (A)** Anzahl der methylierten Gene in der DNA von *K-ras*<sup>G12D</sup>/*lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>**Tumoren und Kontrollgewebe (Wildty** + *lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>) im Venn-Diagramm. **(B)** Mikrosatelliteninstabilitäts-Analyse verschiedener Tumore mit 5 verschiedenen Nukleotid-Markern (weiße Felder bezeichnen MSS, schwarze Felder bezeichnen MSI). **(C-E)** Msh2 Expression im Kontrolltier **(C)**, im Tumor der *K-ras*<sup>G12D</sup>/*lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>-Maus **(D)** und in der Metastase **(E). (F,G)** Mgmt-Expression in der *LSL-Kras*<sup>G12D</sup>/Maus **(F)** und im Tumor der *K-ras*<sup>G12D</sup>/*lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>-Maus **(G). (H)** RT-PCR und mRNA Expression von Mlh-1 und Mgmt im proximalen Kolongewebe von Kontrolltieren (weißer Balken) und im Tumor von *K-ras*<sup>G12D</sup>/*lnk4a*/*Arf*<sup>/-</sup>-Tieren (schwarzer Balken).

Daneben ist insbesondere Methylierung von MGMT in serratierten Adenomen häufig mit einer *KRAS*-Mutation assoziiert, wohingegen eine MLH-1 Methylierung eher mit *BRAF*-mutierten Adenomen einhergeht (Wynter et al., 2004). Weder eine Promotermethylierung von Mgmt noch von Mlh-1 oder anderen MMR-Genen (MSH2, MSH6, Pms2) konnte anhand der *MeDip*-Analyse bestätigt werden. Zusätzlich fand sich in immunohistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten von Tumoren der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen mit Wildtypgewebe keine signifikante Verminderung der Expression von Mgmt (Abb. 11 C-G) oder ein Verlust der Msh2-Expression. Die Ergebnisse aus einer RT-PCR mit RNA aus proximalem Mukosagewebe als Kontrolle und RNA aus Tumoren von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Mäusen zeigen daneben eine aufrechterhaltene Expression der *beiden DNA-Mismatch*-Reparatur-Enzyme Mlh-1 und Mgmt (Abb. 11 H). Eine Funktion von *Mlh-1* in der Kolonkarzinogenese der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse konnte daneben durch die Observierung von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Mlh-1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ausgeschlossen werden. Diese Mäuse wurden durch die Kreuzung von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen mit *Mlh-1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Edelmann et al., 1996) erhalten. Von den 11 untersuchten Tieren in einem Alter von 8 bis 26 Wochen zeigten alle die für die *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus charakteristischen mSH im Kolon, jedoch keine Bildung von höher entwickelten Adenomen.

Da eine *KRAS*-Mutation in humanen serratierten Adenomen mit MSS oder MSI-L korreliert, wurde eine MSI-Analyse der Tumoren aus den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4aArf<sup>/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Dazu wurde Tumor DNA isoliert und auf fünf *Repeat Marker* für MSI-Analysen in Maustumoren (Kabbarah et al., 2003) getestet. Bei der Untersuchung von zehn Tumoren wies nur einer in 2 der 5 Marker eine MSI auf, in 4 weiteren war jeweils nur 1 Marker betroffen (Abb. 11 B). In den restlichen fünf Tumoren waren keine Anzeichen einer MSI zu finden. Man kann daraus schließen, dass MSI in der Karzinogenese von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen keine Rolle spielt, die Tumoren also MSI-L bzw. MSS sind.

### 4.10 Aktivierung von APC/β-catenin in Verbindung mit K-ras<sup>G12D</sup>-Expression induziert Tumorgenese über den klassischen Weg, nicht jedoch über die alternative Route

Tumoren, die über den alternativen, serratierten Signalweg entstehen, entwickeln sich unabhängig von *APC*-Mutationen, während bei klassischen Kolontumoren *APC* eine initiale Funktion hat. Für eine funktionelle Bestätigung, dass die Tumorgenese in den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen über eine alternative Route, unabhängig des APC/ß-catenin-Signalweges initiiert wurde, wurden *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse und Kontrolltiere einmal wöchentlich in einem Zeitraum von 6 Wochen mit 10 mg/kg Azoxymethan (AOM) intraperitonal injiziert. AOM ist ein Karzinogen, welches nach metabolischer Aktivierung zu der Bildung von O<sup>6</sup>-Methyl-Guanin-Addukten führt und in Mäusen zur Induktion von klassischen Kolontumoren verwendet wird (Bollrath et al., 2009). AOM-Injektion führt durch Mutation in Exon 3 von *β-catenin* zu dessen Stabilisierung und somit zur Aktivierung des Wnt-Signalweges (Greten et al., 2004).

16 Wochen nach der ersten Injektion wurden die Tiere getötet und das Kolon entnommen. Die injizierten *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäuse hatten eine etwa 13-fach höhere Tumorinzidenz als die Kontrolltiere (Abb. 12 L). Diese Tumoren waren im Gegensatz zu den Tumoren der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Mäuse ausschließlich distal lokalisiert. Diese Tumoren entsprachen histologisch hauptsächlich den klassischen Kolontumoren, waren tubulär, differenziert und zeigten eine geringe Dysplasie (Abb. 12 A, B).



Abb. 12 K-ras<sup>G12D</sup> beschleunigt Wnt-Signalweg abhängige klassische Karzinogenese, nicht jedoch die Progression alternativer Tumore. H&E-Färbung von AOM-induzierten, klassischen Tumoren im Wildtyptier (A) und in einer *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus (B) und eines villösen Tumors in einer *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus (C). Proliferationsanalyse anhand einer  $\alpha$ -BrdU Immunohistochemie (D,E) und Bestimmung der apoptotischen Zellen im TUNEL (F,G). Die Färbung von  $\beta$ -catenin (H,I) und c-Myc (J,K) in der Immunohistochemie am Tumorgewebe zeigt in beiden Fällen eine nukleäre Lokalisation. (L) Tumorinzidenz nach sechsfacher AOM-Gabe in Kontrolltieren (weißer Balken, n=6) und in *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen (schwarzer Balken, n=5) und (M) mitotischer Index im Tumorgewebe von Kontrolltieren (weißer Balken) und *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen (schwarzer Balken).
Ergebnisse

Eine Ausnahme bildeten einige Tumoren, die einen tubulär-villösen Phänotyp aufwiesen (Abb. 12 C). In keinem der beiden Genotypen wurden, wie etwa bei den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Mäusen, invasive Karzinome gefunden. Um die Apoptoserate und den Proliferationsindex der AOM-induzierten Tumoren zu ermitteln wurde eine  $\alpha$ -BrdU Färbung und eine TUNEL Färbung an Paraffinschnitten angefertigt. Die Anzahl der apoptotischen Zellen war in den Tumoren der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse verringert (Abb. 12 F, G). Auffällig war bei der Bestimmung des mitotischen Index, dass alle Tumoren der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse eine geringere Proliferationsrate als die der Wildtyptiere aufwiesen (Abb. 12 D, E und M). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung waren diese Adenome insgesamt deutlich kleiner als die der Kontrolltiere. Aktivierung des Wnt-Signalweges sowohl in den AOM-induzierten Tumoren der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse als auch der Wildtyptiere wurde anhand immunohistochemischer Färbungen durch die nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -catenin und c-Myc verifiziert.

# 4.11 Serratierte *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Kolontumore weisen einen alternativen, molekularen Fingerabdruck auf

Die Tumoren der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Mäuse grenzen sich bezüglich ihrer Lokalisation, der Histologie und der vom Wnt-Signalweg unabhängigen Entwicklung von klassischen sporadischen Tumoren im Kolon klar ab.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Tumoren um distinkte Entitäten handelte, wurde RNA aus Tumorgewebe dieser Mäuse und von AOMinjizierten *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Mäusen beziehungsweise AOM-injizierten Kontrollmäusen zum Vergleich isoliert und ein RNA-Microarray durchgeführt. Von den 28.000 Genen des Mausgenoms, die auf eine quantitative Expression untersucht wurden, fanden sich 1309 Gene, die in den unterschiedlichen Gruppen signifikant reguliert waren. Eine Darstellung dieser Gene in der *Heatmap* ließ einen klaren Unterschied in dem Expressionsprofil der Tumoren erkennen (Abb. 13 A). Die Tumoren der AOMinjizierten *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-und Wildtyptiere zeigten ein ähnliches Expressionsprofil, während das Expressionsprofil der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Mäuse deutliche Unterschiede aufwies.

Anhand der Histologie und Lokalisation der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Tumoren können Unterschiede zu klassischen, AOM-induzierten Tumoren gefunden werden. In einer Studie von Kaiser et al. wurde das molekulare Profil verschiedener Tumoren miteinander verglichen. Hierbei wurde auch das Expressionsprofil von klassischen

Kolontumoren in APC<sup>min/+</sup>- beziehungsweise AOM-induzierten Tumoren näher beschrieben (Kaiser et al., 2007). Da die Tumoren der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Zeichen von Aktivierung des APC/ $\beta$ -catenin-Signalweges zeigten und sich deshalb von klassischen Tumoren unterscheiden, wurde das Expressionsprofil dieser Tumoren mit dem Profil von *APC*<sup>min</sup>- beziehungsweise AOM-induzierten Tumoren von Kaiser et al. anhand einer *Gene Score Enrichment Analysis* (GSEA) verglichen. GSEA bestimmt die statistische Signifikanz zweier miteinander verglichener Proben, wobei dem Vergleich eine im Vorfeld definierte Gruppe von Genen zugrunde liegt. Dadurch wird eine hohe Übereinstimmung der zwei Proben mit einer hohen *Enrichment Score* ausgedrückt. Durch einen Vergleich der Tumoren wurde wie erwartet eine gute Übereinstimmung des Expressionsprofils der AOM-induzierten Tumoren mit den *APC*<sup>min</sup>/AOM-Tumoren deutlich (Abb. 13 B), während sich die *Kras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Tumoren davon eindeutig unterschieden (Enrichment score 0.83; Signifikanz p<0,001).

Eine RT-PCR Analyse mit der in dem Microarray verwendeten Proben verstärkt das Bild einer alternativen Karzinogenese in der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Maus. Verschiedene Zielgene des Wnt-Signalweges, Axin2, Ascl2, Prox1, Pla2g2a und Cnn3 sind auf mRNA Ebene nur in den klassischen, AOM-induzierten Tumoren hochreguliert (Abb. 13 D), während die serratierten Tumoren der *Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Maus eine charakteristische starke Expression von mRNAs, die für die gastrischen Marker Gkn1, Gkn2, Tff1, Tff2 und Muc5 kodieren, zeigen (Abb. 13 C).

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass sich das Expressionsprofil von Tumoren der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Mäuse von dem Expressionsprofil klassischer Tumoren durch die fehlende Aktivierung des Wnt-Signalweges unterscheidet.



Abb. 13| *K-ras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>Tumore zeigen einen zu klassischen Kolontumoren unterschiedlichen molekularen Fingerabdruck. (A) *Heatmap* einer Affymetrix MOE430A 2.0 Expressionsprofilanalyse von RNA aus Tumorgewebe (Vergleichende Darstellung der Mittelwerte von 2 Kontrolltumoren (*LSL-K-ras*<sup>G12D</sup> +AOM), 3 K-ras-Tumoren (*K-ras*<sup>G12D/int</sup>+AOM) und 3 Karzinomen von *K-ras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Tieren; rot entspricht hoher Expression, grün entspricht geringer Expression. (B) Gene Enrichment Score Analysis (GSEA) von *K-ras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Tumoren und AOM-induzierten Tumoren von Kontrolltieren im Vergleich zu *APC*<sup>min</sup> + AOM Tumoren. Man bemerkt eine gute Korrelation von *LSL-Kras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Tumoren zu *APC*<sup>min</sup> + AOM Tumoren und deutliche Unterschiede von *K-ras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Tumoren zu *APC*<sup>min</sup> + AOM Tumoren. (C,D) RT-PCR Daten von isolierter Tumor-RNA zeigt eine Induktion von gastrischen Markern spezifisch in *K-ras*<sup>G12D</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Tumoren und eine Involvierung von Wnt-Zielgenen spezifisch in den AOM-induzierten Tumoren.

## 4.12 Humane serratierte Adenome mit *KRAS*-Mutation zeigen eine Induktion von p16<sup>INK4A</sup>-abhängiger OIS

Humane hyperplastische Polypen werden als Vorläufer von Adenomen des serratierten Types bezeichnet (Noffsinger, 2009). Sie entwickeln sich nur zu einem geringen Prozentsatz zu Adenomen weiter. In den *K-ras<sup>G12Dint</sup>* -Mäusen ist die Tumorgenese im Kolon durch die Induktion von OIS und begleitender Überexpression von p16 arretiert. Um zu ermitteln, ob auch in *KRAS*-mutierten HP OIS induziert wird, wurde ein Kollektiv aus 18 Polypen des Kolon und Rektum von Patienten, die einer Routineuntersuchung unterzogen wurden, molekular analysiert. Durch eine H&E-Färbung wurde zunächst bestätigt, dass das isolierte Gewebe hyperplastischen Polypen entsprach (Abb. 14 A, B).



Abb. 14 Humane serratierte hyperplastische Polypen zeigen OIS und Expression von p16<sup>INK4A</sup>. (A,B) H&E-Färbung von normaler Mukosa (A) und eines hyperplastischen Polypen (B). (C,D) Expression von p16<sup>INK4A</sup> im hyperplastischen Polypen (D), nicht jedoch in gesunder Mukosa (C). (E,F) Positive SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung im Polypen mit *KRAS*-Mutation (F), und negative Kontrolle des gesunden Gewebes (E). Alle Färbungen wurden an Kryogewebe durchgeführt.

Durch eine *KRAS*-Mutationsanalyse wurden vier von 18 Polypen identifiziert, die eine Mutation im Codon 12 des Gens aufwiesen. Für eine Verifizierung einer OIS in diesen Polypen wurde eine SA-β-Galaktosidase-Färbung druchgeführt, die eine Positivität in 3 dieser 4 Fälle ergab, während das Kontrollgewebe nicht gefärbt war (Abb. 14 E, F). Dieses Ergebnis ging mit einer leicht erhöhten Expression von p16<sup>lnk4a</sup> in allen 3 *KRAS*-mutierten Polypen einher (Abb. 14 C, D).

Um festzustellen, ob eine Expression von p16<sup>lnk4a</sup> in *KRAS*-mutierten serratierten Läsionen ein allgemeines Phänomen ist, und ob eine Tumorprogression von einem p16<sup>lnk4a</sup>-Verlust begleitet wird, wurde eine Analyse an insgesamt 93 serratierten Tumoren durchgeführt. In dieser Gruppe aus TSA, serratierten invasiven Karzinomen und metastasierenden serratierten Karzinomen fanden sich 13 Tumoren, die eine *KRAS* (Codon 12 oder 13)-Mutation, jedoch keine BRAF (V600E)-Mutation hatten und die alle Mikrosatelliten stabil waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ist zusammenfassend in der Tabelle 2 im Anhang dargestellt. Anhand einer immunohistochemischen Färbung konnte eine Expression von MLH-1 in allen Tumoren nachgewiesen werden, eine negative Färbung für Mgmt war nur in zwei Karzinomen zu sehen. Bis auf zwei Fälle zeigten außerdem alle Tumoren ein membranständig lokalisiertes  $\beta$ -catenin, was auf eine normale Wnt-Signalaktivität schließen ließ (Tabelle 2, Anhang; Abb. 15 H, J).

Eine p16<sup>lnk4a</sup>-Expressionsanalyse der humanen Adenome zeigt in sechs von sieben Fällen eine Akkumulation des Proteins teilweise nukleär, sowie zytoplasmatisch. In fünf Fällen war die Färbung stark positiv. In diesen Bereichen war deutlich eine inverse Korrelation der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 und von p16<sup>lnk4a</sup>positiven Zellen zu erkennen (Abb. 15 A-C) In den humanen Karzinomen würde man, verglichen mit dem *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mausmodell, eine Abnahme oder einen Verlust von p16<sup>lnk4a</sup>-Expression erwarten. In einem der sechs Karzinome war ein vollständiger Verlust des Zellzyklusinhibitors zu sehen. In den restlichen fünf Fällen war die Expression heterogen, jedoch in den Bereichen des Karzinoms, insbesondere an der Invasionsfront, stark vermindert oder vollständig verloren gegangen (Abb. 15 C-F). Interessanterweise war p14<sup>Arf</sup>, das Homolog zu p19<sup>Arf</sup> in der Maus, in keinem der Tumoren exprimiert. Im Weiteren wurde der Methylierungsstatus von *p16<sup>lnk4a</sup>* überprüft, der für den Verlust des Proteins verantwortlich sein kann. In den Adenomen gab es nur in drei der sieben Fälle keine Methylierung des *CDKN2A*-



Abb. 15 Humane serratierte Adenome zeigen p16<sup>INK4A</sup>-Expression, die im Karzinom verloren geht. (A-F) Immunohistochemie und inverse Korrelation des Proliferationsmarkers Ki67 und der Expression von p16<sup>INK4a</sup> im Adenom (A,B), im Areal hochgradiger Dysplasie (C,D) und im Karzinom (E,F) (rote Pfeile zeigen Proliferationszonen, die negativ für p16<sup>INK4a</sup> sind, schwarze Pfeile zeigen einen Poliferationsarrest in Arealen mit stark positiver p16<sup>INK4a</sup> Färbung). An der Invasionsfront des Karzinomes ist p16<sup>INK4a</sup> vollständig verloren gegangen (E,F). (G-J) Immunohistochemie von p53 zeigt eine starke Positivität ausschließlich im Karzinom (I),  $\beta$ -Catenin ist sowohl im Adenom (H) als auch im Karzinom membranständig lokalisiert (*J*).

Genpromoters. Alle drei Fälle waren mit einer besonders starken Expression des Proteins assoziiert. In der Gruppe der Karzinome zeigten drei der sechs Fälle eine Methylierung von *CDKN2A*.

Eine Eigenschaft der Karzinome von *K-ras<sup>G12Dint</sup>/p16<sup>lnk4a</sup>/Arf<sup>-/-</sup>* Mäusen besteht in der nukleären Akkumulation von p53, die von einer Mutation des Tumorsupressors unabhängig ist. Um auf dieser Ebene eine Gemeinsamkeit mit den humanen Tumoren zu finden, wurde eine immunohistochemische Färbung des Gewebes mit α-p53 durchgeführt. Diese Färbung war für alle sieben humanen Adenome negativ, fünf von sechs Karzinomen hingegen waren stark nukleär positiv gefärbt (Tabelle 2 und Abb. 15 G, I). Nach einer Mutationsanalyse der Exons 5-8 konnte in keinem der Tumoren eine Mutation gefunden werden, was in Übereinstimmung mit den Resultaten der K-ras<sup>G12Dint</sup>/p16<sup>lnk4a</sup>/Arf<sup>-/-</sup> Maus steht.

## 4.13 Isolation von Tumorzelllinien verschiedenen Genotyps erlaubt vergleichende *in vitro* Experimente von klassichen Tumorzellen und Tumorzellen alternativer Tumoren

Für einen Vergleich der zellulären Eigenschaften der verschiedenen Tumorzellen untereinander wurden in vitro Experimente mit isolierten Tumorzellen durchgeführt. Verwendet wurden Zellen von AOM-induzierten Tumoren einer LSL-K-ras<sup>G12D</sup>-Maus (Zelllinie 1), einer Villin-Cre-Tp53<sup>-/-</sup>-Maus (Zelllinie 2), einer K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus (Zelllinie 3), einer K-ras<sup>G12Dint</sup>/Tp53<sup>-/-</sup>-Maus und von zwei verschiedenen Tumoren einer K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Maus (Zelllinie 4, Zelllinie 5). Westernblot-Analysen (Abb. 16 A) mit  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin und  $\alpha$ -Cytokeratin 8/18 bestätigte die epitheliale Herkunft der isolierten Zellen. Die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin beschränkte sich auf die Tumorzelllinien 2 und 4 und könnte auf eine EMT in diesen Zelllinien hindeuten. Eine Verminderung der Expression von Tgf $\beta$ RII war in den Zelllinien mit *K*-ras<sup>G12D</sup>-Mutation (4 und 5) festzustellen. Ausschließlich in den Zelllinien 4 und 5 aus den proximalen Kolontumoren der Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse war keine Induktion von c-Myc zu sehen. In den Westernblots für verschiedene Zellzyklus-regulierende Proteine wurde lediglich in der Expression von CyclinD1 eine Verstärkung in den Zelllinien 2 und 4 ermittelt, während die Expression in Zelllinie 5 nicht detektiert werden konnte. Die Expression von CyclinE trat in allen Zelllinien gleichmäßig auf. Das DNA-Reperatur-Enzym Mgmt zeigte eine stärkere Expression in den Zelllinien 3 und 5 während MSH2 in keiner der

getesteten Zellen eine Regulation zeigte. Daneben war in der Zelllinie 4 ein Verlust des Proteins Mlh-6 zu sehen.

Ein Kinase Assay von Cdc2 lässt durch die stärkere Phosphorylierung von Histon H1 in Zelllinie 3 eine stärkere Kinaseaktivität vermuten, während im Kinase Assay mit Cdk2 die Zelllinien 1-3 eine stärkere Phosphorylierung von Histon H1 zeigten (Abb. 16 B). In keiner der Zelllinien wurde in dem Kinase Assay mit Cdk4 ein Unterschied in der Phosphorylierung von Rb ermittelt. Die basale Expression der Proteine Cdc2, Cdk2 und Cdk4 blieb in allen Zelllinien unverändert.

Um eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den verschiedenen Zelllinien zu analysieren, wurde ein DNA-Affinitäts-Präzipitations-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich, dass in keiner der Zelllinien eine Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -catenin an ein Oligo mit einer TCF-Bidungsdomäne nachgewiesen werden konnte (Abb. 16 C).

Nach einer Isolierung von RNA aus den verschiedenen Zelllinien ergab sich durch eine RT-PCR vor allem in den Zelllinien 4 und 5 eine verstärkte Expression von mRNAs, die für gastrische Marker kodieren (Abb. 16 D). Des Weiteren wurde in vitro die Wachstumsrate der verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt (Abb. 16 J). Die Zählung der Zellen zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach dem Aussäen ergab, dass die Zelllinien der K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäuse (4 und 5) in der Zellkulturschale das schnellste Wachstum zeigten, während die Zelllinie 1 am langsamsten proliferierte. Eine Injektion der Tumorzellen in Wildtypmäuse wurde für die Analyse des metastasierenden Potenzials der Zellen durchgeführt. Eine intravenöse Injektion in FVB Wildtyptiere von 500.000 Zellen pro Tier führte nach 12 Tagen zu der Bildung einer unterschiedlichen Anzahl von Lungenmetastasen, die abhängig von der injizierten Zelllinie war (Abb. 16 E-I). Während die Injektion von Zelllinie 1 - 3 in dem beobachteten Zeitraum nur wenige Metastasen hervorrief, wurde - im Einklang mit der Wachstumsrate in vitro - die größte Masse an Metastasen in den Mäusen, die mit Zelllinie 4 oder 5 injiziert wurden (H, I) gefunden. Diese Mäuse mussten am Tag 12 aufgrund starker Atembeschwerden getötet werden.



## 4.14 Anhang Ergebnisse

Genotyp	Mäuse (n)	Alter Wochen	Tumorinzidenz Dünndarm	Tumorinzidenz Kolon	Tumoren/ Maus	Inzidenz invasive Karzinome	Inzidenz Lungen Metastasen
Kontrolle	42	36-56	-	-	-	-	-
K-ras <sup>G12Dint</sup>	28	36-68	7/28 (25%)	-	1,14 ± 0,14	-	-
K-ras <sup>G12Dint</sup> /p53 <sup>-/-</sup>	12	30-52	4/12 (30%)	-	1,5 ± 0,5	1/6 (16,6%)	-
K-ras <sup>G12Dint</sup> /Ink4a/Arf <sup>./</sup>	32	5-13	1/32 (3%)	17/32 (53%)	1,52 ± 0,35	13/17 (53%)	8/13 (53%)
K-ras <sup>G12Dint</sup> /Ink4a/Arf/p53 <sup>-/-</sup>	6	8-12	-	-	-	-	-
K-ras <sup>G12Dint</sup> /MIh1- <sup>/-</sup>	11	8-26	8/11 (73%)	-	7,15 ± 1,16	-	-
Mlh1≁	8	6-32	-	-	-	-	-

Tabelle 1 Tumorinzidenz und Tumorlokalisation in den verschiedenen Mauslinien.

Tabelle 2Molekulare Eigenschaften von humanen serratierten Tumoren mit KRAS-<br/>Mutation. (Adenome weiß hinterlegt, invasive Karzinome grau hinterlegt; Intensität der p16-<br/>Expression: +++starke Expression, ++ mäßige Expression, + schwache Expression)

### 5. Diskussion

## 5.1 K-ras<sup>G12D</sup> als Initiator der serratierten Tumorgenese

Unter allen sporadischen kolorektalen Karzinomen ist die Gruppe derer, die über die klassiche Route entstehen, die größte. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges, die mit einer Mutation von *APC* oder Aktivierung von  $\beta$ -Catenin assoziiert ist, spielt dabei eine zentrale Rolle. Das Konzept einer alternativen, von Wnt-Aktivierung unabhängigen Karzinogenese ist in den letzten Jahren etabliert worden. Diese Arbeit stellt nun ein erstes Mausmodell zur Untersuchung der alternativen serratierten Karzinogenese vor.

*KRAS*(G12D)- oder *BRAF*(V600E)-Mutationen treten früh in der alternativen Tumorgenese auf, was darauf hindeutet, dass die RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade als Initiator der alternativen Tumorgenese fungieren könnte. Bereits in anderen Arbeiten wurde erwähnt, dass die Expression von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> zu einer Hyperplasie im Kolon von Mäusen führt. In einem Mausmodell mit *Villin*-Cre-vermittelter Expression von K-ras<sup>G12D</sup> fanden sich hyperplastische Krypten im Kolon der Mäuse (Haigis et al., 2008; Trobridge et al., 2009; Tuveson et al., 2004). Eine nähere Beschreibung oder molekulare Mechanismen, die diesem Phänotyp zugrunde liegen, fehlen jedoch.

Wie hier gezeigt werden konnte, führt die Expression von onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> in Enterozyten des Darmes in der Maus zu einer selektiven Aktivierung von Erk und initiiert spezifisch im Kolon die serratierte Karzinogenese.

In vielen Punkten besteht zwischen den hyperplastischen Polypen im Kolon der *Kras*<sup>G12D/nt</sup>-Maus und humanen hyperplastischen Polypen, welche als prämaligne Läsionen der serratierten Karzinogenese gelten, eine große Ähnlichkeit. Diese Charakteristika beinhalten sowohl tiefe, serratierte Krypten, horizontales Wachstum der Krypten und *Crypt-Fission*, wodurch die Verlängerung des Darmes in der *Kras*<sup>G12D/nt</sup>-Maus zu erklären ist, als auch eine gesteigerte Proliferation sowie Anomalien in der Population von Becherzellen.

Die Entstehung früher Adenome wurde histologisch durch das "Bottom-up" und "Topdown" Modell beschrieben (Jass et al., 2002) (Abb. D1). Bei dem Bottom-up Modell geht man von einem Ursprung der malignen Zellen in der basalen Krypte aus, die durch die basal-apikale Migration der Epithelzellen die Krypte einnehmen. In diesem

Modell kann es durch die Kombination von Inhibition von Apoptose in den Enterozyten und Proliferationssteigerung zu einer Akkumulation von Epithelzellen kommen. Die Krypten sind hier durch eine sägeblattartige (serratierte) Erscheinung und eine Verlängerung oder durch horizontales Wachstum gekennzeichnet. Bei dem "Top-Down" Modell hingegen wird ein Mechanismus vermutet, der dazu führt, dass maligne Zellen sich vom apikalen Epithel der Krypte ausbreiten (Shih et al., 2001). Die Existenz des "Top-down" Modells steht mittlerweile jedoch in Frage (Preston et al., 2003; Radtke and Clevers, 2005).

Histologisch betrachtet finden sich in der *K-ras<sup>G12DInt</sup>*-Maus Gemeinsamkeiten zu dem Bottom-up Modell serratierter Polypen. Ein entscheidender Unterschied zu dem *"Top-Down"* Modell ist die Beibehaltung der Organisation innerhalb der Krypte, in der die proliferative Zone sich am basalen Ende befindet. Die proliferative Zone ist in der *K-ras<sup>G12DInt</sup>*-Maus in Übereinstimmung mit diesem Modell auf die basale Hälfte der Krypten beschränkt und die Krypten zeigen im gesamten Kolon eine serratierte Struktur.



Abgeändert nach Jass JR, 2002

Abb. D1| Serratiertes Kryptenmodell. "Bottom-up" Modell (A) in dem die proliferative Zone ausgedehnt ist, sich aber basal in der Krypte befindet. Die Organisation der Kryptenachse bleibt erhalten und die Abschilferung der apikalen Zellen ist gehemmt. Dieses Modell gibt das eines serratierten Adenoms wieder, gut zu erkennen an der sägezahnartigen Struktur des Epithels. "Top-down" Modell (B), in dem sowohl das Oberflächenepithel, als auch die Krypte zur Proliferationszone gehört.

Serratierte Adenome verschiedener Entwicklungsstadien können als Merkmal eine erhöhte Mukussekretion im Zusammenhang mit veränderter Becherzellpopulation (Makinen, 2007) zeigen. Oft ist eine *KRAS*-Mutation in serratierten Adenomen mit der becherzellreichen Variante assoziiert (O'Brien et al., 2004). In der Kolonmukosa der *K-ras*<sup>G12DInt</sup>-Maus ist ebenfalls stellenweise eine Ansammlung von Mukus und eine unregelmäßige Verteilung von Becherzellen zu beobachten, obwohl eine quantitative Analyse der mRNA und eine Alcian Blue-Färbung hier eine Verringerung von Muc2 bzw. der Becherzellen erkennen lässt. Diese widersprüchlichen Daten

lassen sich durch die Verlängerung der Krypten und die erhöhte Anzahl von Enterozyten in der *K-ras<sup>G12DInt</sup>*-Maus erklären, wodurch es lediglich zu einer relativen Verringerung von Becherzellen kommt. Darüber hinaus wurde im Einklang mit einer in humanen serratierten Adenomen auftretende Überexpression von Mukus in höher entwickelten serratierten Adenomen der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Maus eine stark gesteigerte Expression des gastrischen Markers Muc5 nachgewiesen.

## 5.2 Der Effekt von K-ras<sup>G12D</sup>-Expression auf die Proliferation von Enterozyten

Die Hyperplasie im Kolon der *K-ras*<sup>G12DInt</sup>-Maus spiegelt, wie oben erwähnt, die *"Bottom-up"* Morphogenese wider. Anhand dieses Modells und im Einklang mit dem Wissen aus der humanen Pathologie ist die proliferative Zone in der *K-ras*<sup>G12DInt</sup>-Maus auf die basalen Krypten beschränkt. In einem Alter von 16 Wochen konnte interessanterweise bei den Tieren trotz Aktivierung von Erk keine Hyperproliferation in den Krypten des Kolons nachgewiesen werden. Das steht im Kontrast zu anderen Arbeiten, in denen *Villin*-Cre-vermittelte Expression von K-ras<sup>G12D</sup> zu einer Hyperproliferation im Kolonepithel führte (Calcagno et al., 2008; Haigis et al., 2008; Trobridge et al., 2009). Parallel zu diesen Arbeiten zeigte eine Proliferationsanalyse der induzierbaren *Cre*<sup>ERT2</sup>-*K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus auch hier eine früh auftretende Hyperproliferation, die 21 Tage nach der ersten Induktion der K-ras<sup>G12D</sup>-Expression jedoch auf den basalen Wert reduziert war.

Im Dünndarm hingegen konnte eine signifikante Hyperproliferation ermittelt werden, die eine Erklärung für die Tumorinzidenz der Tiere von 25% erklärt. Diese Tumorinzidenz ist deutlich niedriger als in einer transgenen Maus mit *Villin*-Crevermittelter K-ras<sup>G12V</sup>-Expression (Janssen et al., 2002). Diesem Mausmodell liegt allerdings eine Überexpression des Onkogens zugrunde und nicht, wie in dem hier beschriebenen Modell, eine Expression ausgehend von dem endogenen Promoter.

Diese kontroversen Ergebnisse zeigen, dass im Jejunum und im Kolon unterschiedliche molekulare Mechanismen zu unterschiedlichen Effekten führen können. Im Kolon der Mäuse, wo nur initial eine Hyperproliferation gezeigt werden konnte, wird ein Wachstumsarrest der Polypen durch die Onkogen-induzierte Seneszenz vermittelt.

### 5.3 Die K-ras<sup>G12D</sup>-vermittelte Onkogen-induzierte Seneszenz

Die Aktivierung von onkogenem K-ras hat eine selektive Aktivierung des Ras-Raf Mek-Erk-Signalweges in der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus zur Folge, während andere MAP-Kinase-Kaskaden oder der Akt/PKB Signalweg nicht beeinflusst werden. Dieser Signalweg ist in einer Vielzahl von Tumoren und in kolorektalen Karzinomen aktiviert. Sowohl Ras als auch Raf sind dabei die am häufigsten mutierten Proteine (Downward, 1990), die zu einer konstitutiven Aktivierung der Signalkaskade führen. Die Aktivierung dieses Signalweges ist außerdem einer der Hauptinitiatoren von Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) (Bardeesy and Sharpless, 2006). In der kolorektalen Karzinogenese konnte die Induktion von OIS hier unter Verwendung der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden.

#### 5.3.1 Seneszenz als Tumorsupressormechanismus

In vielen Geweben kann es im Laufe der Zeit zur Entstehung kleiner Neoplasien kommen, von denen sich jedoch nur ein sehr geringer Teil zu einem malignen Tumor weiterentwickelt. Melanozytische Nävi sind ein Beispiel hierfür, die ab einer bestimmten Größe aufhören zu wachsen und nicht zu agressiveren Tumoren transformieren (Pollock et al., 2003). Ein Tumorwachstum kann einerseits durch die zur Progression nötige Akkumulation von Mutationen oder Aktivierung von Onkogenen limitiert sein. Selten auftretende Mutationen sind für die Tumorzellen zur vollen Transformation zum malignen Phänotyp notwendig. Desweiteren spielt Angiogenese im Tumorgewebe eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum. Für den Wachstumsarrest von Tumorzellen kann aber auch ein anderer Mechanismus verantwortlich sein: die Seneszenz.

Replikative Seneszenz ist definiert als ein Zustand von irreversiblem Wachstumsarrest, bei dem die Zellen in einen Ruhezustand eintreten (Hayflick and Moorhead, 1961). Entdeckt wurde dieses Phänomen in *in vitro* Studien, in denen beobachtet wurde, dass Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen aufhören zu proliferieren und seneszent werden, was durch eine Akkumulation von SA-β-Galaktosidase in den Zellen, eine flache, breite Morphologie und eine Regulation von Tumorsupressor Genen wie *Ink4a, Arf, Tp53* oder *Rb* begleitet ist. Der Eintritt in die Seneszenz ist hierbei durch die bei jeder Zellteilung hervorgerufene Verkürzung von Telomeren in der DNA zu erklären. Zellen, die Telomerase überexprimieren, können der Seneszenz entkommen und zeigen eine unlimitierte

Teilungsrate. Auch Krebszellen haben Fähigkeiten entwickelt die Induktion von Seneszenz zu umgehen, indem eine höhere Menge an Telomerase produziert wird, die die Verkürzung der Telomere verringert (Stewart and Weinberg, 2006).



Abb. D2| Seneszenz als Tumorsupressormechanismus. Aktivierung von Onkogenen führt zur Bildung einer Läsion, die durch weitere Mutationen zu einem Karzinom transformieren kann, oder durch Regulation von Tumorsupressorgenen in einen seneszenten Zustand eintritt und das Tumorwachstum hemmt.

Nicht nur durch die Anzahl der Zellteilungen, sondern auch durch DNA-Schäden kann Seneszenz induziert werden. In vitro wurde die Induktion von Seneszenz durch DNA Schäden, hervorgerufen durch erhöhte Sauerstoffzufuhr, in Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs), nachgewiesen (Parrinello et al., 2003). Die Behandlung verschiedener Zelllinien mit einem Topoisomeraseblocker, der DNA Schäden induziert, führte zu einem p53-abhängigen Wachstumsarrest (te Poele et al., 2002). Als dritter Faktor kann eine Induktion von Seneszenz auch durch Aktivierung von Onkogenen in der Zelle hervorgerufen werden und spielt deshalb auch in der Tumorgenese als Tumorsupressormechanismus eine entscheidende Rolle (Collado and Serrano, 2005). Die Induktion wird hierbei durch konstitutive Signalaktivität, häufig durch Involvierung der Ras-Raf-Mek-Erk MAPK Kaskade und Regulation der Proteine des Ink4a/Arf Lokus oder Tp53 innerhalb der Zelle getriggert, man spricht von onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) (Serrano et al., 1997). Onkogenes Ras konnte Seneszenz in primären humanen Zellen (human diploid fibroblasts, IMR90), sowie in MEFs hervorrufen (Serrano et al., 1997). Die Aktivierung eines H-rasV12 Allels in den Zellen führte dabei zu irreversiblem Wachstumsarrest, der durch eine erhöhte Expression von p53 und Ink4A begleitet war. Eine Kooperation von OIS mit

Diskussion

DNA Schäden assoziierter Seneszenz wird ebenfalls vermutet (Bartkova et al., 2006). dieser Studie sich nach In finden Onkogenaktivierung DNA Doppelstrangbrüche und Zeichen einer DNA Stressantwort in den Zellen. Hier konnte Seneszenz sowohl in vitro als auch in humanen Präneoplasien im Kolon gezeigt werden. In Präneoplasien von Lymphomen wurde eine durch onkogenes N-ras vermittelte Induktion von Seneszenz bestätigt, die abhängig von der Aktivierung der Methyltransferase Suv39h1 war (Braig et al., 2005). Ferner wurde in vivo ein Wachstumsarrest im Zusammenhang mit Aktivierung von onkogenem K-rasV12 in der Lunge und im Pankreas (Collado et al., 2005) sowie bei einer Aktivierung von BRAF(V600E) in der Lunge von Mäusen beschrieben (Dankort et al., 2007). In diesen durch onkogenes BRAF induzierten Lungentumoren wurde nur im Zusammenhang mit Ink4a/Arf-Verlust oder Tp53-Verlust ein Tumorwachstum hervorgerufen. In humanen Nävi, gutartigen Melanozytentumoren, ist ebenfalls durch Aktivierung von BRAF(V600E) in Mäusen OIS nachgewiesen worden, die vor allem mit einer Induktion der Expression von p16<sup>INK4a</sup> einherging (Michaloglou et al., 2005). In einem weiteren *in vivo* Modell wurde Seneszenz als Tumorsupressormechanismus in der Prostata von Mäusen bestätigt. Die Deletion des Tumorsupressors Pten oder von Tp53 in der Prostata von Mäusen führte zwar zur Induktion von Tumoren, die aber aufgrund von induzierter Seneszenz nicht zu invasiven Karzinomen transformierten (Chen et al., 2005). Erst bei kombinierter Deletion von Pten und Tp53 kam es zur Aufhebung der Seneszenz und damit zur Metastasierung der Tumoren. Onkogen-induzierte Seneszenz ist demnach ein Tumorsupressormechanismus, der durch aktivierende Mutationen in Onkogenen hervorgerufen und durch eine Aktiverung von Tumorsupressorgenen wie Ink4a oder Tp53 aufrechterhalten wird. Ein Verlust dieser Tumorsupressorgene hebt die Seneszenz auf und führt zur Progression der Tumoren und zur Bildung von Karzinomen.



#### 5.3.2 Der Ink4a/Arf-Lokus

Der *Ink4a/Arf*-Lokus kodiert für drei verschiedene Proteine: Ink4a (p16), Arf (p14 human, p19 Maus), Ink4b (p15), und ist für die Induktion von Seneszenz von besonderer Bedeutung. Er spielt eine große Rolle sowohl in der altersabhängigen, als auch in der DNA Schäden-vermittelten und onkogen-induzierten Seneszenz (Shay and Roninson, 2004). *p16<sup>Ink4a</sup>* ist in etwa 30% aller humanen Krebsarten mutiert (Ruas and Peters, 1998) und eine Überexpression von Ink4a/Arf in Mäusen führt zu einer reduzierten Tumorinzidenz (Matheu et al., 2004). Mäuse, bei denen eines der beiden Proteine deletiert ist, zeigen eine deutlich gesteigerte Tumorentstehung und erhöhtes Tumorwachstum (Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 2004).

Die vom *Ink4a/Arf*-Lokus kodierten Proteine p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>Arf</sup> unterscheiden sich durch alternatives Splicing voneinander (Abb. D3). p16<sup>Ink4a</sup> ensteht durch Transkription von Exon 1 $\alpha$ , 2 und 3, Arf aus 1 $\beta$ , 2 und 3. Obwohl beide Proteine gemeinsame Exons teilen, sind sie in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und somit auch ihrer Funktion verschieden, da sie in unterschiedlichen *Frames* translatiert werden. *p15<sup>Ink4b</sup>* besteht aus 2 Exons, die keine Gemeinsamkeiten mit *p16<sup>Ink4a</sup>* oder p19<sup>Arf</sup> aufweisen.

Für eine vom *Ink4a/Arf* Lokus abhängige Induktion von OIS kommen vor allem zwei Signalwege in Frage. Erstens die Aktivierung des p16<sup>Ink4a</sup>-Rb Signalweges und zweitens die Regulation des Tumorsupressors Tp53 durch p19<sup>Arf</sup> (Abb. D3). p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>Arf</sup> gehören zu den Zellzuyklus regulierenden Proteinen und werden unter normalen Bedingungen in der Zelle in niedriger Konzentration konstitutiv exprimiert. Kommt es durch Aktivierung von Onkogenen zu einer OIS wird dies oft durch eine Überexpression von p16<sup>Ink4a</sup> oder p19<sup>Arf</sup> beziehungsweise p53 vermittelt.

Das Protein p16<sup>lnk4a</sup> kann direkt mit Cdk4 und Cdk6 interagieren, indem es einen Komplex mit ihnen bildet und deren Aktivierung im Zusammenhang mit CyclinD hemmt. Als Folge der daraus resultierenden konstitutiven Aktivierung von Rb werden zellzyklusregulierende Zielgene des Transkritionsfaktors E2F nicht mehr transkribiert. Da p16<sup>lnk4a</sup> nicht mit anderen Cdks interagiert, sind die Zellen in diesem Fall in der G1-Phase arretiert. Verlust von p16<sup>lnk4a</sup> führt zu einer Steigerung der Proliferation und kann zur Progression des Tumorwachstums führen.

p19<sup>Art</sup> ist ein negativer Regulator des p53 Inhibitors Mdm2, welches p53 ubiquitinieren kann und dessen proteasomalen Abbau bedingt (Sherr and Weber, 2000; Weber et al., 2000). Eine Überexpression von p19<sup>Arf</sup> hat demnach eine Aktivierung von Tp53 zur Folge. Zu den *Downstream*-Zielen von Tp53 gehört das Protein p21<sup>cip1/waf1</sup>, ein Antagonist von Cyclin-Cdk Komplexen, dessen Aktivierung einen Arrest der betroffenen Zellen in der G1- oder G2-Phase herbeiführt (Bunz et al., 1998).

In dem hier vorgestellten Mausmodell ist OIS von zentraler Bedeutung. Die Expression des Onkogens führt über die Aktivierung von Erk zur Induktion von Seneszenz im Kolon der Mäuse, die einer Hyperproliferation entgegen wirkt und ein weiteres Wachstum der hyperplastischen Polypen unterbindet. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die OIS von der Regulation des *Ink4a/Arf*-Lokus abhängig ist. Der Verlust von *Ink4a/Arf* in der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus führte wie erwartet zu der Progression der hyperplastischen Läsionen zu Adenomen und Karzinomen.

Wie in dieser Arbeit an humanen hyperplastischen Polypen mit *KRAS*-Mutation verdeutlicht werden konnte, hat p16-abhängige OIS auch hier eine Bedeutung in der Tumorgenese.

## 5.4 Die OIS in den hyperplastischen Polypen ist abhängig von p16<sup>lnk4a</sup>-Expression

Im Gegensatz zu den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen, von denen keine einen höher entwickelten Tumor bis zu einem Alter von 17 Monaten im Kolon zeigte, liegt in den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Tieren die Tumorinzidenz schon in einem Alter von 12 Wochen über 50%, die meisten Tiere entwickeln sogar invasive Karzinome. Das unterstreicht die Bedeutung des *Ink4a/Arf*-Lokus im Zusammenhang mit der OIS in diesem Modell.

Obwohl es in dieser Maus zu der kombinierten Deletion von p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>Arf</sup> kommt, wurden hier starke Indizien dafür geliefert, dass die Tumorgenese und die Induktion von Seneszenz von p16<sup>lnk4a</sup> alleine abhängig ist und nicht von p19<sup>Arf</sup>. Sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene konnte in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus eine spezifische Expression von p16<sup>Ink4a</sup>, nicht jedoch von p19<sup>Arf</sup> oder p53 gezeigt werden. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Kreuzung von K-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen mit Tp53<sup>-/-</sup>-Mäusen unterstrichen, bei denen es durch die Deletion von Tp53 zur Inaktivierung des Seneszenzsignalweges über die p19<sup>Arf</sup>-Tp53-Achse kommt. Diese Tiere zeigten auch nach 12 Monaten keine Veränderung des Phänotyps im Kolon im Vergleich zu den K-ras<sup>G12DInt</sup>-Mäusen und keine Bildung von Adenomen. Hierbei ist zu beachten, dass in der verwendeten Ink4a/Arf-Maus der gesamte Organismus von der Deletion betroffen ist, wobei p53 nur in intestinalen Epithelzellen deletiert ist, die Effekte des Stroma auf die Karzinogenese also nicht beurteilt werden können. Weiterhin entspricht die Aktivierung von p53 über die Arf-Mdm2-Achse zwar dem allgemein angenommenen Modell der Arf-vermittelten Tumorsuppression, darüber hinaus konnten aber p53-unabhängige Effekte von p19Arf gezeigt werden. Durch in vitro Experimente konnte ein p19-induzierter Wachstumsarrest in p53defizienten Zellen gezeigt werden (Carnero et al., 2000) und ein Mausmodell mit dreifacher Deletion von p19Arf, Mdm2 und p53 zeigte eine höhere Inzidenz in der Entwicklung multipler Tumoren als Mdm2<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> Mäuse (Weber et al., 2000). Ergebnisse der Analyse von MEFs deuten auf eine Funktion von p19 abseits der Mdm2-p53 Achse hin (Weber et al., 2000). Für eine genauere Untersuchung des Effektes von p19Arf in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus ist demnach neben der hier verwendeten K-ras<sup>G12DInt</sup>/Tp53<sup>-/-</sup>-Maus die Analyse der K-ras<sup>G12DInt</sup>/p19<sup>Arf-/-</sup>-Maus notwendig.

Die Experimente mit den humanen Präparaten unterstützen den Mechanismus der p16<sup>lnk4a</sup>-abhängigen OIS in den Polypen. In den hyperplastischen Polypen mit KRAS-Mutation kam es zu einer OIS, die mit einer verstärkten Expression von p16<sup>INK4A</sup> assoziiert war. Dies zeigt, dass eine OIS in humanen Polypen induziert werden kann, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass diese Läsionen so selten eine Transformation zum Adenom zeigen. Desweiteren bestätigt dies den Mechanismus der p16<sup>INK4A</sup>-abhängigen Tumorgenese in diesen Polypen. Die Färbungen an den höher entwickelten humanen serratierten Tumoren zeigen, dass die im Mausmodell beschriebenen Veränderungen auch im Menschen eine Relevanz haben. Die Expression von p16<sup>INK4A</sup> korrelierte invers mit zunehmendem Grad der Tumorprogression. Während die serratierten Adenome von einer starken Überexpression von p16<sup>INK4A</sup> gekennzeichnet waren, war diese jedoch vor allem an der Invasionsfront der Karzinome stark verringert oder vollständig verloren p16<sup>INK4A</sup> Verlust von eine gegangen. Der konnte zum Teil durch Promoterhypermethylierung von CDKN2A erklärt werden. Auch in Bezug auf einen selektiven Verlust von p16<sup>INK4A</sup> ist das vorgestellte Mausmodell auf die humane Pathologie übertragbar. p14<sup>Arf</sup>, das humane Homolog zu p19<sup>Arf</sup> in der Maus. ist auch in den humanen serratierten Adenomen nicht reguliert, was zusätzlich die Bedeutung von p16<sup>INK4A</sup> und nicht von p14<sup>Arf</sup> für die Tumorprogression hervorhebt.

Durch die Verwendung der *Ink4a/Arf*-Maus kommt es im gesamten Tier zu der Deletion sowohl von p16 als auch von p19. Dadurch können Effekte auf die Tumorprogression, die nur durch eine Deletion von p16 oder p19 stattfinden, nicht ermittelt werden. Die Deletion beider Zellzyklusinhibitoren bedeutet die Inaktivierung des p16-Rb Signalweges und des p19-p53 Signalweges, was in jedem Fall zu einer Aufhebung einer Ink4a/Arf-abhängigen Seneszenz führt. Für eine genauere Aussage über die Involvierung von p16 oder p19 in der OIS sind andere Mausmodelle notwendig (K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a oder K-ras<sup>G12Dint</sup>/Arf).

Ein weiterer Faktor, der im Hinblick auf die Tumorinzidenz von *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Tieren zu beachten ist, ist die gewebsunspezifische Deletion des *Ink4a/Arf*-Lokus in dieser Maus. Neben der Deletion im Kolonepithel kommt es unter anderem zu einer Deletion in myeloiden Zellen, wodurch das Stroma beeinflusst wird. In einer Studie konnte in Patienten mit kolorektalen Adenomen eine genetische Instabilität nicht nur im epithelialen Tumorgewebe sondern auch im Stroma nachgewiesen werden (Ishiguro et al., 2006; Umeto et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass

nicht nur das Kolonepithel sondern auch das Stroma zur Entwicklung von kolorektalen Karzinomen beitragen kann. Ein Effekt der *Ink4a/Arf*-Deletion in der hier verwendeten Maus ist eine extramedulläre Hämatopoiese in der Milz und in der Leber sowie die Bildung von Fibrosarkomen und Lymphomen in einem Alter von 36 Wochen (Serrano et al., 1996). Das lässt erkennen, dass diese Tiere bereits ohne die Kombination mit onkogenem K-ras<sup>G12D</sup> eine Neigung zur Tumorbildung haben. Eine Bildung von Tumoren beschränkt sich allerdings auf die genannten Organe und Gewebe und betrifft nicht den Darm. Die Verwendung von *Villin*-Cre-vermittelter *p16*-oder *p19*-Deletion wird in diesem Mausmodell Aussagen über die Effekte dieser Proteine alleine im Darmepithel auf die Tumorgenese der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus machen können. Durch die Untersuchung dieser Modelle könnte dann auch genauer der Effekt der hier verwendeten *Villin*-cre-vermittelten *p53*-Deletion beurteilt werden.

### 5.5 Die Rolle von CIMP/MSI in der Tumorprogression der *Kras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus

Als zusätzliches genetisches Ereignis für die Entstehung der serratierten Karzinome in der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Maus kommt die Involvierung einer Methylierung von MMR-Genen oder eine MSI in Frage. Diese Merkmale sind häufig in der humanen alternativen Karzinogenese zu finden (Makinen, 2007; Noffsinger, 2009).

In den serratierten Tumoren mit *KRAS*-Mutation ist die Inaktivierung von Mgmt beschrieben worden (Jass et al., 2006; Wynter et al., 2004). Ein Verlust dieses Gens wurde hier jedoch weder in der Methylierungsanalyse im MeDIP-Chip der Karzinome von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen noch in den histologischen Färbungen bestätigt. Andere Gene, TIMP3, FHIT, SLC5A8, die eine Promotermethylierung in serratierten Adenomen aufwiesen (Dong et al., 2005), oder Gene, die zu den klassichen oder den neu eingeführten CIMP-Markern von humanen Tumoren gehören (Weisenberger et al., 2006), waren ebenfalls in *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Karzinomen nicht methyliert. Darüber hinaus konnte für keines der MMR-Gene Msh2, Msh6 und Pms2, die speziell in MSI-H Tumoren methyliert sein können, eine Promoterhypermethylierung festgestellt werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die untersuchten Tumoren CIMP-negativ sind. Zumindest in Bezug auf Mgmt stehen diese Resultate im Einklang mit den Daten der humanen Tumoren, die alle bis auf zwei der Karzinome eine deutliche MGMT-Expression zeigten.

Ein Verlust des Gens *Mlh-1* kann ebenfalls mit serratierten Tumoren assoziert sein, die jedoch meist durch eine *BRAF*-Mutation und nicht durch eine *KRAS*-Mutation gekennzeichnet sind (Wynter et al., 2004). Auch hier sprechen die gezeigten Daten, im Einklang mit den Daten aus den hier untersuchten humanen Tumoren, nicht für eine Funktion dieses Proteins in der Tumorgenese der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Maus. Das konnte durch die Observierung von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Mlh-1<sup>-/-</sup>*-Mäusen verifiziert werden. Im Kolon dieser Mäuse fanden sich auch nach 6 Monaten keine Adenome.

Karzinome mit MSI sind gewöhnlich mit einer Promotermethylierung von MMR-Genen assoziiert. Vereinbar mit den Ergebnissen der CIMP-Analysen der Tumoren wurde sowohl in den Tumoren der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Maus eine MSI-L oder MSS als auch in den humanen Adenomen und Karzinomen eine MSS festgestellt. Dieses Resultat ist gut mit dem von Wynter et al. vorgestellten Modell für die serratierte Tumorprogression vereinbar (Wynter et al., 2004), in dem MSI-L oder MSS mit einer *KRAS*-Mutationen einhergeht. Dass zumindest in den humanen Karzinomen eine Methylierung anderer Gene von Bedeutung sein kann, erklärt sich durch die Tatsache, dass der p16-Verlust in den serratierten Karzinomen von einer *CDKN2A*-Promotermethylierung abhängig war.

In den Karzinomen der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Maus wurde bemerkenswerterweise eine verstärkte nukleäre Färbung von p53 festgestellt. Entsprechend wurde auch in den humanen serratierten Karzinomen, nicht jedoch in den Adenomen, eine starke nukleäre Färbung des Tumorsupressors ermittelt. Durch die Mutationsanalyse von p53 sowohl der murinen Tumoren als auch der humanen Karzinome konnte in den Exons 5-8 keine Mutation nachgewiesen werden. Die Hintergründe für die gesteigerte Expression von p53 sind unklar, da in den *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Mäusen p19<sup>Arf</sup> als Regulator für Tp53 ausscheidet und auch eine Involvierung von p14<sup>Arf</sup> in den humanen Tumoren durch die immunohistochemische Färbung unwahrscheinlich erscheint. *p53* scheint jedoch in der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Maus keine wesentliche Rolle zu spielen, da es bei der Kreuzung der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>*-Maus mit einer *Tp53<sup>-/-</sup>*-Maus weder eine Zunahme der kolorektalen Tumorizidenz noch eine Beschleunigung der Tumorprogression gab (Tabelle 1).

## 5.6 *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Karzinome entwickeln sich APCunabhängig

Serratierte Adenome entwickeln sich gewöhnlich unabhängig von einer Aktivierung des Wnt-Signalweges.

Im Einklang mit der humanen serratierten Tumorgenese zeigen die Karzinome der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus eine membranständige Lokalisation von  $\beta$ -catenin. Parallel dazu spricht die negative Mutationsanalyse von  $\beta$ -catenin für eine von APC unabhängige Tumorgenese in der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus. Diese Vermutung konnte durch die Verwendung des AOM-Modells für die Induzierung der klassischen Karzinogenese bestätigt werden, in dem die proximale, alternative Tumorentstehung durch AOM-Injektion der *K*-ras<sup>G12Dint</sup>-Mäusen nicht induziert werden konnte. Die klassische Tumorgenese war durch die Kooperation von APC und onkogenem K-ras in den AOM-injizierten *K*-ras<sup>G12Dint</sup>-Tieren hingegen gesteigert und führte zu einer etwa 13-fach höheren Tumorinzidenz. Dieses Phänomen verdeutlicht die Dominanz von *APC* über *K*-ras in der klassischen Tumorentstehung und unterstützt die These, dass *KRAS*-Mutationen das Tumorwachstum in der klassischen Tumorgenese beschleunigen aber nicht initiieren können (Sansom et al., 2006).

Interessanterweise wurde trotz der höheren Tumorinzidenz in den Tumoren der AOM-injizierten *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen, verglichen mit den Kontrollmäusen, ein verringerter mitotischer Index ermittelt. Im Einklang damit waren die *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Adenome insgesamt deutlich kleiner als die der Kontrolltiere. Dies ist ein Hinweis darauf, dass möglicherweise auch eine Induktion von Seneszenz und eine damit verbundene Hemmung der Proliferation in diesen Tumoren eine Rolle spielt. AOM-Injektion von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Tp53<sup>-/-</sup>*-Mäusen hingegen führte zu einer höheren Tumorinzidenz und einer gesteigerten Proliferation in den Tumoren. Diese Tatsache könnte für eine Induktion von Seneszenz in *K-ras*-mutierten Tumoren über p53 sprechen und OIS im Zusammenhang mit der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz zeigen, welche bei Verlust von p53 aufgehoben würde. Ob Tumoren der AOM-injizierten *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse tatsächlich Zeichen einer OIS zeigen, müssen zukünftige Experimente klären.

### 5.7 Mechanismen der Tumorprogression in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus

In Mausmodellen mit endogener K-ras-Expression wurde gezeigt, dass zusätzliche Faktoren zur Aktivierung von onkogenem K-ras für die Tumorprogression notwendig sind. Diese Faktoren können entweder eine initiale Aktivierung des Wnt-Signalweges beinhalten (Haigis et al., 2008; Sansom et al., 2006) oder mit einer Mutation im  $Tqf\beta$ -Signalweg assoziiert sein (Trobridge et al., 2009). In humanen serratierten Adenomen mit KRAS-Mutation treten APC-Mutationen oder p53-Mutationen selten auf. Das macht deutlich, dass eine Tumorprogression von BRAF- oder KRASmutierten serratierten Adenomen nicht durch chromosomale Instabilität gefördert wird, sondern vielmehr mit epigenetischen Veränderungen oder MSI einhergeht. Obwohl *KRAS*-mutierte serratierte Adenome meist eine geringe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L oder MSS) und eine geringe Methylierung (CIMP-L oder CIMP-negativ) aufweisen, ist eine Kombination dieser Faktoren mit der initialen des doch die wahrscheinlichste, Aktivierung Onkogens die zu einer Tumorprogression führt (Makinen, 2007). In der hier verwendeten K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus reicht lediglich die Deletion von Ink4a/Arf ohne Kooperation von Methylierung, Mikrosatelliteninstabilität oder Mutationen in APC/β-catenin und p53 aus, um in 53% der Tiere die Bildung von Adenomen und invasiven Karzinomen zu ermöglichen. Aufgrund des prozentualen Anteils der Tiere, die keine fortgeschrittenen Tumoren entwickelten, ist davon auszugehen, dass noch weitere Faktoren bei der Progression eine entscheidende Rolle spielen könnten. Auch die hier gezeigten humanen Daten fundieren diese Aussage. Zwar war in den meisten Fällen eine verringerte Expression oder ein Verlust von p16 zu sehen, in jeweils 2 der 6 Karzinome fanden sich jedoch nukleäre  $\beta$ -catenin-Expression oder ein Verlust von Mgmt (Tabelle 2). Keiner der Tumoren war dagegen von einem Verlust von Mlh-1 oder einer Mutation von p53 betroffen. Welche Gene zusätzlich bei der Progression dieser humanen Tumoren und in der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus von Bedeutung sein können, muss zukünftig bestimmt werden. Anhand der hier gezeigten Daten kann die serratierte Tumorgenese durch eine KRAS-Mutation initiert werden, die Progression hängt von methylierungsbedingtem Verlust von p16<sup>INK4A</sup>, zusätzlichen epigenetischen Veränderungen oder von weiteren Mutationen ab (Abb. D4).

## 5.8 Charakterisierung der Lungenmetastasen der *Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-*Mäuse

Nur etwa 50% der *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Mäuse sind im Alter von 12 Wochen von der Entstehung eines höherentwickelten Tumors betroffen. Dies liegt vor allem daran, dass die Tiere aufgrund der Entstehung von primären Lungenadenomen zu einem Zeitpunkt getötet werden mussten, zu dem sie noch keinen Kolontumor entwickelt haben.

Das häufge Auftreten von Metastasen in den K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen zeigt, dass die murinen serratierten Karzinome ein hohes malignes Potenzial besitzen. In der Lunge waren die nebeneinander lokalisierten Lungenadenome und die Metastasen anhand ihrer Histologie gut voneinander zu unterscheiden. Für eine molekulare Unterscheidung primärer Lungentumore von Metastasen mit kolorektaler Herkunft wurden die Expressionsmuster von CK20, CK7 und TTF1 miteinander verglichen. Die Expression von CK20 ist vor allem auf das Magenepithel und intestinale Epithelzellen des Dünn- und Dickdarmes beschränkt (Moll et al., 1992). Dieses Protein wird als gängiger Marker für kolorektale Karzinome und Metastasen mit intestinaler Herkunft verwendet, in denen es häufig eine starke Überexpression zeigt, während es in Lungenadenomen negativ ist. CK7 gilt vorallem als Marker für Lungenadenome, kürzlich wurde jedoch auch eine Koexpression von CK7 mit CK20 in Kolontumoren des serratierten Typs nachgewiesen (Tatsumi et al., 2005). Hier wurde eine Zunahme der Expression mit dem Grad der Tumorprogression bestätigt, am stärksten war die Expression im serratierten Kolonkarzinom. In dieser Arbeit wurde CK7 Expression als möglicher Marker für Tumoren der serratierten Route vorgeschlagen. Die positiven Färbungen der beiden Keratine CK7 und CK20 in den Metastasen unterstützen diese Hypothese. Interessanterweise konnten trotz der für Lungenadenome spezifischen TTF1 Färbung in Kpositiven. den ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> Mäusen in denselben Tumoren keine positive CK7 Färbung gezeigt werden, was im Kontrast zu einer Studie von Kummar et al. steht, bei der 100% der untersuchten primären Lungenadenome CK7 positiv waren (Kummar et al., 2002).

#### 5.9 In vitro-Analyse von Zelllinien verschiedener Tumorentitäten

Mit der Isolierung der spezifischen Tumorzelllinien aus den verwendeten Mauslinien ist es möglich auch *in vitro* spezielle Eigenschaften insbesondere der Zelllinien der

serratierten Tumoren zu identifizieren. Zu beachten hierbei ist allerdings die eingeschränkte Aussagekraft der vergleichenden molekularen Analysen und Signalwegaktivitäten der unterschiedlichen Zelllinien, da durch die Kultivierung weitere zufällige Mutationen in nicht vorhersagbaren Genen auftreten. Die metastasierenden Eigenschaften der unterschiedlichen Zelllinien konnte *in vivo* durch intravenöse Injektion in Mäuse analysiert werden und die Ergebnisse sind mit den *in vitro*-Daten der Proliferations- und Zellzyklusanalysen gut vereinbar.

zeigen die *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-*Zelllinien sowohl die höchste Demnach Proliferationsrate als auch die größte metastasierende Zellmasse in der Lunge der injizierten Mäuse. Diese Ergebnisse stehen im Einklang damit, dass die Mehrzahl der K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Karzinome im Gegensatz zu den AOM-induzierten Tumoren metastasierend waren. Vereinbar mit der APC-unabhängigen Route der serratierten Karzinogenese konnte in den Zellinien 4 und 5 keine Aktivierung von  $\beta$ -catenin durch den DAPA oder eine Mutationsanalyse bestätigt werden. Interessanterweise konnte ebensowenig in den Zelllinien der AOM-Tumoren eine Aktivierung von β-catenin gezeigt werden. Auch die Aktivierung der  $\beta$ -catenin Zielgene in den Zelllinien, die in den AOM-Tumoren der Mäuse hochreguliert waren, zeigten auf mRNA-Ebene deutliche Abweichungen (Daten nicht gezeigt). Die für die serratierten Karzinome charakteristische Expression von mRNAs, die für die gastrischen Marker Gkn1, Tff1, Tff2 und Muc5 kodieren, konnte jedoch auch in den K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup> (Gkn1, Tff2, Muc5) Zelllinien beziehungsweise in den AOM-induzierten K-ras<sup>G12Dint</sup>/Tp53<sup>-/-</sup>-Tumorzellen (Tff1) nachgewiesen werden (Abb. 16 D) Diese Ergebnisse zeigen, dass eine K-ras-Mutation mit einer erhöhten Expression von gastrischen Markern assoziiert sein kann.

Diese Ergebnisse lassen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in den Charakteristika der Zelllinien zu den jeweiligen Tumoren der Mäuse erkennen und verdeutlichen eine eingeschränkte Aussagekraft der *in vitro*-Experimente. Weitere molekulare Analysen sind hier notwendig, um genauere Eigenschaften der genetisch unterschiedlichen Zelllinien zu ermitteln.

### 5.10 Gemeinsamkeiten und Unterschiede früherer K-ras-

#### Mausmodelle und der K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus

Im Vergleich zu anderen Mausmodellen mit intestinaler K-ras-Aktivierung zeigt das hier vorgestellte Modell sowohl Parallelitäten als auch Unterschiede. Im Einklang mit allen anderen Modellen führte die Expression des K-ras-Onkogens (K-rasG12D ebenso wie K-rasV12G) zu einer selektiven Aktivierung der Mek-Erk-MAPK-Kaskade (Calcagno et al., 2008; Haigis et al., 2008; Janssen et al., 2002; Trobridge et al., 2009). Dadurch bedingt wurde im Kontrast zu der hier verwendeten K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus in den jüngsten Studien mit endogener K-ras<sup>G12D</sup>-Expression nicht nur im Dünndarm sondern auch im Kolon der Mäuse eine Hyperproliferation induziert (Calcagno et al., 2008; Haigis et al., 2008; Janssen et al., 2002; Trobridge et al., 2009). In diesen Modellen wurde ein mit unserer Maus vergleichbarer hyperplastischer Phänotyp des Kolonepithels beschrieben, wobei- mit unseren Ergebnissen im Einklang- die Bildung von Neoplasien oder Adenomen in keinem der Tiere zu sehen war. Dass eine Induktion von Seneszenz ein Grund für eine gehemmte Tumorprogression sein könnte, wurde jedoch in keiner der Studien vorgeschlagen. Die Induktion von OIS in unserem Modell kann ein Grund dafür sein, dass im Kolon der Tiere keine Hyperproliferation gezeigt werden konnte. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gefestigt, dass die in der Cre<sup>ERT2</sup>-K-ras<sup>G12Dint</sup>-Maus ermittelte initiale Hyperproliferation (6 Tage nach der ersten Tamoxifengabe) zu einem späteren Zeitpunkt (21 Tage) nicht mehr observiert wurde.

In den anderen Mausmodellen wurde eine Tumorprogression in den Tieren entweder durch eine Aktivierung der klassichen Tumorgenese durch AOM-Injektion (Calcagno et al., 2008) oder durch Mutation von *APC* erreicht (Calcagno et al., 2008; Haigis et al., 2008; Sansom et al., 2006). Dies stellte onkogenes K-ras als Beschleuniger der kolorektalen Karzinogenese, nicht jedoch als Initiator dar. Darüber hinaus wurde eine *APC*-unabhängige Tumorgenese nur in Verbindung mit dem Verlust von  $Tgf\beta1$ beschrieben (Trobridge et al., 2009). Obwohl *KRAS* als einer der Schlüsselmutationen der serratierten Karzinogenese bekannt ist, wurde es in keinem der Modelle als Initiator der alternativen serratierten Karzinogenese beschrieben.

# 5.11 Unterschiedliche Effekte der K-ras<sup>G12D</sup>-Expression auf das Jejunum und das Kolon

Durch die Analysen des Jejunums und des Kolons der *K-ras<sup>G12Dint</sup>*-Maus traten deutliche Unterschiede in Bezug auf die Homöostase der Epithelzellen und die Tumorinzidenz auf. In beiden Organen wurde durch die Expression des Onkogens eine Aktivierung von Erk gezeigt, die im Kolon zu einer Induktion von Seneszenz führte, im Jejunum jedoch eine Hyperproliferation und die Bildung einzelner

Adenome begünstigte (Ergebnisse, Tabelle 1). In dem hyperproliferativen Epithel des Jejunums von *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäusen reichte darüber hinaus entweder eine zusätzliche Deletion von p53 oder eine Deletion von Mlh-1 aus, um die Tumorinzidenz deutlich zu steigern (Ergebnisse, Tabelle 1). Die Deletion von *Mlh-1* im Darm der Maus führt erst nach etwa 5 Monaten zur Entstehung von intestinalen Adenomen (Edelmann et al., 1999). Die *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/*Mlh-1*<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen zeigten schon ab einem Alter von 2 Monaten multiple Adenome, die ausschließlich im Dünndarm lokalisiert waren (Tabelle 1). Dieses Ergebnis bestätigt, dass K-ras eine Tumorprogression im Dünndarm nicht nur in Kooperation mit *APC* sondern auch durch andere zusätzliche Mutationen begünstigen kann. Die Deletion des *Ink4a/Arf*-Lokus hatte im Dünndarm der *K-ras*<sup>G12Dint</sup>-Mäuse jedoch keinen Effekt auf die Tumorinzidenz, was dadurch zu erklären ist, dass hier keine p16-abhängige Seneszenz gezeigt werden konnte.

Im Kolon inhibiert die OIS eine Hyperproliferation der Epithelzellen und ist dominant über andere Mutationen. Erst durch die Aufhebung der Seneszenz in der *K*-*ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>-Maus, nicht jedoch in Verbindung mit p53- oder MIh-1-Deletion oder durch AOM-Injektion wird im Kolon eine Tumorprogression der mSH entlang der serratierten Route ermöglicht.

# 5.12 Die *K-ras<sup>G12Dint</sup>-*Maus als Modell für die serratierte Karzinogenese

Dadurch, dass serratierte Tumoren entweder durch eine frühe *BRAF*- oder *KRAS*-Mutation gekennzeichnet sind, wird deutlich, dass die Aktivierung der Ras-Raf-Mek-Erk-Kaskade in der Entstehung dieser Adenome von zentraler Bedeutung ist. Trotz der Aktivierung des gleichen Signalweges ist es möglich, dass diese beiden Gene einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung von serratierten Tumoren haben, da sie sich im molekularen Muster, in dem Grad der Methylierung, der Mikrosatelliteninstabilität und in der Lokalisation unterscheiden können (Mäkinen, 2007). Im Vergleich der murinen Tumoren mit den analysierten humanen Karzinomen mit *KRAS*-Mutation konnten viele Parallelitäten nachgewiesen werden. Die humanen hyperplastischen Polypen weisen auf histologischer Ebene eine grosse Ähnlichkeit zu den murinen serratierten Polypen auf. Ein entscheidender Faktor für die Entwicklung der serratierten Karzinome im Allgemeinen ist die Unabhängigkeit von *APC*-Mutationen. Das Konzept einer *APC*-unabhängigen, durch die RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade initiierte serratierte Karzinogenese, konnte in dieser Arbeit mit dem vorgestellten Mausmodell bestätigt werden. In den weiter fortgeschrittenen humanen Adenomen ist- wie auch in Karzinomen der K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus festgestellt wurde- eine Assoziation von KRAS-Mutation mit APC-unabhängiger Tumorgenese zu finden, was darauf hindeutet, dass diese Tumoren tatsächlich entlang einer alternativen Route entstehen. Darüber hinaus wurde in den KRASmutierten humanen Karzinomen parallel zu den murinen Karzinomen eine MSS und im Einklang damit weder ein Verlust von Mgmt noch von Mlh-1 (Ergebnisse, Tabelle 2) gefunden. In Hinsicht auf das Konzept in dem eine KRAS-Mutation meist mit MSS zeigen oder MSI-L einhergeht (Noffsinger, 2009), diese Daten qute Übereinstimmungen. Die hier durchgeführten Analysen beinhalten allerdings keinen Vergleich zu serratierten Karzinomen mit BRAF-Mutation. Da sich Mutationen von BRAF und KRAS in serratierten Karzinomen gegenseitig ausschließen, ist es durchaus möglich, dass das vorgestellte Mausmodell im Vergleich zu humanen serratierten Tumoren mit BRAF-Mutation auf molekularer Ebene Abweichungen zeigt. Eine weitere interessante Gemeinsamkeit der murinen mit den humanen invasiven Karzinomen ist die erhöhte, mutationsunabhängige Expression von p53. Ob diese Beobachtung nur auf einen Teil der KRAS-mutierten serratierten Tumoren zutrifft oder ein generelles Phänomen von serratierten Karzinomen ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Durch die Analyse von humanen kolorektalen Polypen konnte hier neben den molekularen Gemeinsamkeiten humaner und muriner Tumoren auch ein gemeinsamer Mechanismus von p16-abhängiger, Onkogen-induzierter Seneszenz gezeigt werden. In Parallelität zu den murinen serratierten Polypen zeigten humane kolorektale hyperplastische Polypen sowohl eine erhöhte Expression von p16 als auch eine Induktion von Seneszenz. Die Expression des Zellzyklusinhibitors war in den serratierten Adenomen nochmals gesteigert. Eine Progression zu invasiven Karzinomen war wie in den *K-ras*<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen mit einem Verlust von p16 assoziiert. Das Konzept einer Induktion von Seneszenz über die Aktivierung der Ras-Raf-Mek-Erk-Kaskade ist bisher weder in *KRAS*-mutierten noch in *BRAF*-mutierten Kolontumoren beschrieben worden.

Welche allgemeine Relevanz die hier von uns verwendete *K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>*-Maus in Bezug auf die humane serratierte Karzinogenese und eine OIS in kolorektalen Tumoren hat, werden zukünftige Studien zeigen.



Abb. D4 Modell der serratierten Karzinogenese über eine initiale *KRAS*-Mutation. Aktivierung des Okogens führt zur Induktion von OIS und Expression von p16. Die Progression vom serratierten HP zum Adenom wird durch Verlust von p16 vermittelt. Weitere Faktoren, die zur Progression zum Karzinom beitragen können sind CIMP, MSI oder der Verlust anderer Tumorsupressorgene.

#### 6. Zusammenfassung

Die K-ras<sup>G12DInt</sup>-Maus stellt ein Modell zur Untersuchung der alternativen serratierten Karzinogenese dar. Die Expression des K-ras<sup>G12D</sup>-Onkogens in Enterozyten des Darms führt zur selektiven Aktivierung der Raf-Mek-Erk- Signalkaskade im Darmepithel der Mäuse. Während es dadurch in den Tieren im Dünndarm zu einer Hyperproliferation und einer Tumorinzidenz von 25% in einem Zeitraum bis zu 17 Monaten kommt, zeigt sich im Kolon der Mäuse die Bildung von hyperplastischen Polypen, jedoch keine damit einhergehende Hyperproliferation. Phänotypisch ähnelt das hyperplastische Epithel der K-ras<sup>G12DInt</sup>-Maus humanen hyperplastischen Polypen, die sich entlang der alternativen Route und unabhängig von APC entwickeln. Eine Progression der murinen Polypen zu höher entwickelten Tumoren konnte in den Mäusen nicht beobachtet werden. Vielmehr ist eine durch Erk-Aktivierung bedingte Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) im Kolonepithel der Grund für einen Wachstumsarrest der Tumoren. Die Induktion von OIS in der Kras<sup>G12DInt</sup>-Maus wird dabei über die Expression des Zellzyklusinhibitors p16<sup>Ink4a</sup> gesteuert. Durch Deletion von Ink4a/Arf in der K-ras<sup>G12DInt</sup>-Maus kommt es in 12 Wochen alten K-ras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Mäusen zur Aufhebung der OIS, zu einer Tumorinzidenz von 53% sowie zur Bildung von metastasierenden Karzinomen mit einem serratierten Phänotyp im proximalen Kolon. Im Einklang mit dem Wissen aus der humanen Pathologie entwickeln sich die serratierten Karzinome der Kras<sup>G12Dint</sup>/Ink4a/Arf<sup>/-</sup>-Maus über eine von APC unabhängige Route. Eine molekulare Charakterisierung dieser Tumoren konnte unterstützend zeigen, dass es sich um MSS oder MSI-L und CIMP-negative Karzinome handelt.

Eine Relevanz von p16<sup>INK4A</sup>-abhängiger Seneszenz konnte auch in der humanen serratierten, *KRAS*-vermittelten Tumorgenese bestätigt werden. In hyperplastischen Polypen wurde eine OIS durch erhöhte Expression von p16 begleitet. In den serratierten Adenomen konnte eine inverse Korrelation zwischen starker p16 Expression und dem Proliferationsmarker Ki67 gezeigt werden, während die Progression zum invasiven Karzinom mit Methylierung von *CDKN2A* und dem daraus folgenden Verlust von p16 assoziiert war.

Diese Ergebnisse schlagen onkogenes KRAS und die Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK- Signalkaskade als Initiator der alternativen serratierten Tumorgenese sowie als Regulator von OIS in der kolorektalen Karzinogenese vor.

### 7. Literatur

Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. Mol Cell Biol *20*, 2475-2487.

Bardeesy, N., and Sharpless, N. E. (2006). RAS unplugged: negative feedback and oncogeneinduced senescence. Cancer Cell *10*, 451-453.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature *444*, 633-637.

Boivin, G. P., Washington, K., Yang, K., Ward, J. M., Pretlow, T. P., Russell, R., Besselsen, D. G., Godfrey, V. L., Doetschman, T., Dove, W. F., *et al.* (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. Gastroenterology *124*, 762-777.

Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res *58*, 5248-5257.

Bollrath, J., Phesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., *et al.* (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. Cancer Cell *15*, 91-102.

Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 49, 4682-4689.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature *436*, 660-665.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science 282, 1497-1501.

Calcagno, S. R., Li, S., Colon, M., Kreinest, P. A., Thompson, E. A., Fields, A. P., and Murray, N. R. (2008). Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. Int J Cancer *122*, 2462-2470.

Capella, G., Cronauer-Mitra, S., Pienado, M. A., and Perucho, M. (1991). Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. Environ Health Perspect *93*, 125-131.

Carnero, A., Hudson, J. D., Price, C. M., and Beach, D. H. (2000). p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. Nat Cell Biol *2*, 148-155.

Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature *436*, 725-730.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature *436*, 642.

Collado, M., and Serrano, M. (2005). The senescent side of tumor suppression. Cell Cycle 4, 1722-1724.

Collins, C. J., and Sedivy, J. M. (2003). Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. Aging Cell 2, 145-150.

Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C. Y., Roche, P. C., Burgart, L. J., and Thibodeau, S. N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. Cancer Res *58*, 3455-3460.

Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. Genes Dev *21*, 379-384.

De Filippo, C., Luceri, C., Caderni, G., Pacini, M., Messerini, L., Biggeri, A., Mini, E., Tonelli, F., Cianchi, F., and Dolara, P. (2002). Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers. Scand J Gastroenterol *37*, 1048-1053.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 9363-9367.

Dong, S. M., Lee, E. J., Jeon, E. S., Park, C. K., and Kim, K. M. (2005). Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. Mod Pathol *18*, 170-178.

Downward, J. (1990). The ras superfamily of small GTP-binding proteins. Trends Biochem Sci 15, 469-472.

Eaden, J. A., and Mayberry, J. F. (2000). Colorectal cancer complicating ulcerative colitis: a review. Am J Gastroenterol *95*, 2710-2719.

Edelmann, W., Cohen, P. E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., *et al.* (1996). Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. Cell *85*, 1125-1134.

el Marjou, F., Janssen, K. P., Chang, B. H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. Genesis *39*, 186-193.

Esteban, L. M., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J. M., *et al.* (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. Molecular and cellular biology *21*, 1444-1452.

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell *61*, 759-767.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol *18*, 581-592.

Garber, J. E., Goldstein, A. M., Kantor, A. F., Dreyfus, M. G., Fraumeni, J. F., Jr., and Li, F. P. (1991). Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. Cancer Res *51*, 6094-6097.

Goldstein, N. S., Bhanot, P., Odish, E., and Hunter, S. (2003). Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. Am J Clin Pathol *119*, 778-796.

Grady, W. M., and Markowitz, S. D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. Annu Rev Genomics Hum Genet *3*, 101-128.

Grady, W. M., Myeroff, L. L., Swinler, S. E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J. D., Neumann, A., Brattain, M. G., Chang, J., Kim, S. J., *et al.* (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. Cancer Res *59*, 320-324.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res *54*, 4855-4878.

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell *118*, 285-296.

Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K. M., *et al.* (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. Nat Genet *40*, 600-608.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25, 585-621.

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., *et al.* (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell *4*, 437-450.

Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. Hum Mutat 21, 271-276.

Imperiale, T. F., Wagner, D. R., Lin, C. Y., Larkin, G. N., Rogge, J. D., and Ransohoff, D. F. (2002). Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. N Engl J Med *346*, 1781-1785.

Ishiguro, K., Yoshida, T., Yagishita, H., Numata, Y., and Okayasu, T. (2006). Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. Gut *55*, 695-702.

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. Genes Dev *15*, 3243-3248.

Janssen, K. P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., *et al.* (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. Gastroenterology *131*, 1096-1109.

Janssen, K. P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. Gastroenterology *123*, 492-504.

Jass, J. R. (1999). Serrated adenoma and colorectal cancer. J Pathol 187, 499-502.

Jass, J. R. (2001). Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? J Pathol *193*, 283-285.

Jass, J. R., Baker, K., Zlobec, I., Higuchi, T., Barker, M., Buchanan, D., and Young, J. (2006). Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer. Histopathology *49*, 121-131.

Jass, J. R., Whitehall, V. L., Young, J., and Leggett, B. A. (2002). Emerging concepts in colorectal neoplasia. Gastroenterology *123*, 862-876.

Jen, J., Powell, S. M., Papadopoulos, N., Smith, K. J., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. Cancer Res *54*, 5523-5526.

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. Genes Dev *11*, 2468-2481.

Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. Nat Genet *29*, 418-425.

Kabbarah, O., Mallon, M. A., Pfeifer, J. D., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Goodfellow, P. J. (2003). A panel of repeat markers for detection of microsatellite instability in murine tumors. Mol Carcinog *38*, 155-159.

Kaiser, S., Park, Y. K., Franklin, J. L., Halberg, R. B., Yu, M., Jessen, W. J., Freudenberg, J., Chen, X., Haigis, K., Jegga, A. G., *et al.* (2007). Transcriptional recapitulation and subversion
of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. Genome Biol 8, R131.

Kambara, T., Simms, L. A., Whitehall, V. L., Spring, K. J., Wynter, C. V., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., McGivern, A., Matsubara, N., *et al.* (2004). BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. Gut *53*, 1137-1144.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G., and Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. Cell *91*, 649-659.

Keller, J. W., Franklin, J. L., Graves-Deal, R., Friedman, D. B., Whitwell, C. W., and Coffey, R. J. (2007). Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. J Cell Physiol *210*, 740-749.

Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87, 159-170.

Kummar, S., Fogarasi, M., Canova, A., Mota, A., and Ciesielski, T. (2002). Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma. Br J Cancer *86*, 1884-1887.

Lee, H. Y., Suh, Y. A., Lee, J. I., Hassan, K. A., Mao, L., Force, T., Gilbert, B. E., Jacks, T., and Kurie, J. M. (2002). Inhibition of oncogenic K-ras signaling by aerosolized gene delivery in a mouse model of human lung cancer. Clin Cancer Res *8*, 2970-2975.

Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., and Gumucio, D. L. (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. J Biol Chem 277, 33275-33283.

Makinen, M. J. (2007). Colorectal serrated adenocarcinoma. Histopathology 50, 131-150.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer *3*, 459-465.

Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martin-Cabellero, J., Flores, J.M., Klatt, P., Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. Genes Dev. *18*(*22*), *2736-46*.

McLellan, E. A., Owen, R. A., Stepniewska, K. A., Sheffield, J. P., and Lemoine, N. R. (1993). High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. Gut *34*, 392-396.

Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2005). BRAFE600associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720-724. Moll, R., Lowe, A., Laufer, J., and Franke, W. W. (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol *140*, 427-447.

Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. Science *260*, 1658-1661.

Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2006). Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. N Engl J Med *355*, 1037-1046.

Munoz, N. M., Upton, M., Rojas, A., Washington, M. K., Lin, L., Chytil, A., Sozmen, E. G., Madison, B. B., Pozzi, A., Moon, R. T., *et al.* (2006). Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. Cancer Res *66*, 9837-9844.

Noffsinger, A. E. (2009). Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. Annu Rev Pathol *4*, 343-364.

O'Brien, M. J., Yang, S., Clebanoff, J. L., Mulcahy, E., Farraye, F. A., Amorosino, M., and Swan, N. (2004). Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. Am J Surg Pathol *28*, 423-434.

Oh, K., Redston, M., and Odze, R. D. (2005). Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. Hum Pathol *36*, 101-111.

Omerovic, J., Hammond, D. E., Clague, M. J., and Prior, I. A. (2008). Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. Oncogene 27, 2754-2762.

Omerovic, J., Laude, A. J., and Prior, I. A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. Cell Mol Life Sci *64*, 2575-2589.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. Nat Cell Biol *5*, 741-747.

Plowman, S. J., Williamson, D. J., O'Sullivan, M. J., Doig, J., Ritchie, A. M., Harrison, D. J., Melton, D. W., Arends, M. J., Hooper, M. L., and Patek, C. E. (2003). While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable. Mol Cell Biol *23*, 9245-9250.

Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet *33*, 19-20.

Potter, J. D. (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. J Natl Cancer Inst *91*, 916-932.

Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature *359*, 235-237.

Preston, S. L., Wong, W. M., Chan, A. O., Poulsom, R., Jeffery, R., Goodlad, R. A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W. F., *et al.* (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. Cancer Res *63*, 3819-3825.

Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. J Cell Biol *160*, 165-170.

Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. Science *307*, 1904-1909.

Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature *370*, 527-532.

Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta *1378*, F115-177.

Sansom, O. J., Meniel, V., Wilkins, J. A., Cole, A. M., Oien, K. A., Marsh, V., Jamieson, T. J., Guerra, C., Ashton, G. H., Barbacid, M., and Clarke, A. R. (2006). Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 14122-14127.

Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. Science 277, 333-338.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 7, 295-308.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R. A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. Cell *85*, 27-37.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell 88, 593-602.

Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Sending out an SOS. Nat Genet 39, 8-9.

Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H., and DePinho, R. A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. Oncogene *23*, 379-385.

Shaw, R. J., and Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature *441*, 424-430.

Shay, J. W., and Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. Oncogene 23, 2919-2933.

Sherr, C. J., and Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. Curr Opin Genet Dev 10, 94-99.

Shih, I. M., Wang, T. L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S. R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 2640-2645.

Smith, A. J., Stern, H. S., Penner, M., Hay, K., Mitri, A., Bapat, B. V., and Gallinger, S. (1994). Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. Cancer Res *54*, 5527-5530.

Stewart, S. A., and Weinberg, R. A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. Annu Rev Cell Dev Biol 22, 531-557.

Taketo, M. M. (2006). Mouse models of gastrointestinal tumors. Cancer Sci 97, 355-361.

Tateyama, H., Li, W., Takahashi, E., Miura, Y., Sugiura, H., and Eimoto, T. (2002). Apoptosis index and apoptosis-related antigen expression in serrated adenoma of the colorectum: the saw-toothed structure may be related to inhibition of apoptosis. Am J Surg Pathol *26*, 249-256.

Tatsumi, N., Mukaisho, K., Mitsufuji, S., Tatsumi, Y., Sugihara, H., Okanoue, T., and Hattori, T. (2005). Expression of cytokeratins 7 and 20 in serrated adenoma and related diseases. Dig Dis Sci *50*, 1741-1746.

te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. Cancer Res *62*, 1876-1883.

Torlakovic, E., Skovlund, E., Snover, D. C., Torlakovic, G., and Nesland, J. M. (2003). Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. Am J Surg Pathol 27, 65-81.

Trobridge, P., Knoblaugh, S., Washington, M. K., Munoz, N. M., Tsuchiya, K. D., Rojas, A., Song, X., Ulrich, C. M., Sasazuki, T., Shirasawa, S., and Grady, W. M. (2009). TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway. Gastroenterology *136*, 1680-1688 e1687.

Tuveson, D. A., Shaw, A. T., Willis, N. A., Silver, D. P., Jackson, E. L., Chang, S., Mercer, K. L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., *et al.* (2004). Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. Cancer Cell *5*, 375-387.

Umeto, H., Yoshida, T., Araki, K., Yagishita, H., Mikami, T., and Okayasu, I. (2009). Appearance of epithelial and stromal genomic instability in background colorectal mucosa of sporadic colorectal cancer patients: relation to age and gender. J Gastroenterol 44, 1036-1045.

Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer 2, 489-501.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med *319*, 525-532.

Voice, J. K., Klemke, R. L., Le, A., and Jackson, J. H. (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. The Journal of biological chemistry 274, 17164-17170.

Weber, J. D., Jeffers, J. R., Rehg, J. E., Randle, D. H., Lozano, G., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Zambetti, G. P. (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. Genes Dev *14*, 2358-2365.

Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., *et al.* (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet *38*, 787-793.

Wynter, C. V., Walsh, M. D., Higuchi, T., Leggett, B. A., Young, J., and Jass, J. R. (2004). Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. Gut *53*, 573-580.

Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J. F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem 273, 24052-24056.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ACF	Aberrant Crypt Focus
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Arf	Alternative reading frame
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumine
Cdk	Cyclin dependent kinase
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2a
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIMP-(L)/(H)	CpG Island Methylator Phenotype-(Low)/(High)
CIMP-neg	CpG Island Methylator Phenotype-negative
c-jun	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
Ck	Cytokeratin
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
Erk	Extacellular signal-related protein kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAP	Familial Adenomateous Polyposis
FVB	Friend leukemia virus B strain
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanin-diphosphat
GEF	Guanine Exchange Factor
GSEA	Gene Enrichment
Gsk3	Glykogen Synthase Kinase 3
Gst	Glutathione S-transferase
GTP	Guanin-triphosphat
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HNPCC	Hereditery Nonpolyposis Colorectal Cancer
HP	Hyperplastischer Polyp
Ink4a	Inhibitor of kinase 4 a
int	Intestine
IP	Immunpäzipitation
Jnk	c-jun NH2-terminal kinase
K-Ras	Kirsten-Ras
LCM	Laser Capture Microdissection
LSL	Lox-Sop-Lox
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mek	Mitogen activated protein kinase kinase
MEKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
Mgmt	0-6-methylguanine-DNA-methyltransferase
Mlh-1	mutL homolog1
MMR	Mismatch repair
MP	Mixed Polyp

MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSI-(L)/(H)	Mikrosatelliteninstabilität-(Low)/(High)
mSP	Murine serratierte Hyperplasie
MSS	Mikrosatellitenstabil
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
PBS	Phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAF	Rat fibrosarcoma
RalGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
$SA-\beta-Galaktosidase$	Senescence-associated beta-Galactosidase
SM-actin	smooth muscle actin
SSA	Sessiles serratiertes Adenom
TAM	Tamoxifen
TGF	Transforming growth factor
TgfbRII	Transforming growth factor receptor 2
TSA	Traditionelles serratiertes Adenom
TTF1	Thyroid transcription factor 1
Wnt	Maus-Homolog zu wingless (Wg)
wt	Wildtyp
TUNEI	TdT mediated dI ITP biotin nick and labeling

## Danksagung

Ich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Schemann für die Betreuung der Doktorarbeit am Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

Vor allem möchte ich mich bei Dr. Florian Greten für eine exzellente, engagierte und zeitaufwendige Betreuung bedanken. Ich habe in den letzten Jahren sehr viel gelernt und mir wurde durch diese Arbeit eine gute Ausgangsposition für eine akademische Karriere geschaffen. Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Canan Arkan bedanken, die zusammen mit Florian ein sehr gutes Team von Betreuern bildet.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, vor allem Julia Bollrath, Tim Nebelsiek und Alexander Fingerle für die gegenseitige Unterstützung und die vielen gemeinsamen lustigen Stunden innerhalb und ausserhalb des Labors. Im Anschluss daran möchte ich mich sehr bei Rabea, Birgit, Kristin und Kerstin für die große Hilfe bei den Genotypisierungen und anderen Laborarbeiten bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Kirchner, Dr. Andreas Jung, Dr. Lydia Kriegel, Sabine Pfeiffer und Janusz Minda von dem Pathologischen Institut der LMU für die Bereitstellung und die große Hilfe mit den humanen Daten sowie für den zusätzlichen Platz im Mausstall. Vielen Dank auch an Dr. Monther Bajbouj, der uns humane Polypen zur Verfügung stellte.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Jörg Mages und Dr. Reinhard Hoffmann für die Auswertung der Microarray Daten.

Bei Prof. Roland Schmid möchte ich mich für die vielen erlebnisreichen Ausflüge und Abende innerhalb des Instituts bedanken.

Vielen Dank Birte, dass du auch in unbefriedigenden Arbeitsphasen oder an langen Arbeitstagen immer die nötige Ermutigung und das nötige Verständis aufgebracht hast!