

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Roland. M. Schmid)

**Analyse eines genetisch definierten porcinen
APC^{1311/+} Modells zur Identifizierung von
Zielstrukturen für die Früherkennung des
Kolonkarzinoms**

Ronja Antoinette Heisel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dieter Saur

2. Prof. Dr. Ronland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 20.12.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.10.2018 angenommen.

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Materialien	26
2.1 Allgemeine Materialien und Geräte	26
2.2 Reagenzien	27
2.3 Kits	28
2.4 Antikörper	28
2.5 Primer	29
2.6 Lösungen und Master Mix	29
3 Methoden	31
3.1 Tiermodell und Extraktion von Gewebe	31
3.1.1 Schweinmodell, $APC^{1311/+}$, $APC^{1311/+}$ und $TP53^{R167H/+}$, $APC^{1311/+}$ und $KRAS^{G12D/+}$	31
3.1.2 Extraktion von Gewebe	32
3.2 Histologie	33
3.2.1 Gewebefixation und Anfertigung von Gewebeschnitten	33
3.2.2 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten	34
3.2.3 Auswertung und Dokumentation	35
3.3 RNS- Analyse	35
3.3.1 RNS Isolation und Reverse Transkription	35
3.3.2 Quantitative Echtzeit- PCR	37
3.4 Detektion fluoreszierender Sonden an Gefrierschnitten	38
3.4.1 Aufbereitung der Proben	38
3.4.2 Detektion der CCKBR- Sonde mittels konfokalem Lasermikroskop	38
3.4.3 Dokumentation	39
3.5 Statistik	39
3.5.1 Statistische Tests und Auswertung	39
3.5.2 Stichprobengrößen	39

4	Ergebnisse	41
4.1	<i>Eingehende Analyse der Polypentstehung im APC- mutierten Schweinmodell</i>	41
4.1.1	Phänotypische Variation im APC ^{1311/+} - Schweinmodell	41
4.1.2	Histopathologische Analyse des APC ^{1311/+} - Modells	45
4.2	<i>Analyse der Expression von Cathepsinen als Zielstrukturen für Molekulare Bildgebung des Kolonkarzinoms</i>	49
4.2.1	Expression der Cathepsine B, D, H, L und S in Adenomen von APC ^{1311/+} und APC ^{1311/+} , TP53 ^{R167H/+} - Schweinen	49
4.3	<i>Analyse der Expression des CCKB- Rezeptors als Zielstruktur für Molekulare Bildgebung des Kolonkarzinoms</i>	55
4.3.1	Expression des CCKB- Rezeptors in Adenomen von APC ^{1311/+} und APC ^{1311/+} , TP53 ^{R167H/+} - Schweinen	55
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	69
8	Danksagung	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom- Karzinom- Sequenz	10
Abbildung 2: Wnt- Signalweg.....	14
Abbildung 3: Mögliche Zielstrukturen für Molekulare Bildgebung.....	17
Abbildung 4: Die Rolle des CCKB- Rezeptors in der Tumorentstehung	21
Abbildung 5: Chemische Struktur der Sonde DQ-MG 754	23
Abbildung 6: Veränderungen im APC- Gen der Schweine	24
Abbildung 7: Durchführung der Probengewinnung.....	33
Abbildung 8: Stammbaum des APC- Schweinemodells	42
Abbildung 9: Phänotypische Variation im Tiermodell.....	43
Abbildung 10: Genetischer Hintergrund der Schweine.....	44
Abbildung 11: Histologische Ergebnisse des APC ^{1311/+} - Schweinemodells	48
Abbildung 12: Quantitative Expression der Cathepsine	51
Abbildung 13: Qualitative Expression der Cathepsine.....	54
Abbildung 14: Überexpression des CCKB- Rezeptors in Adenomen des Kolons.....	56
Abbildung 15: In vitro- und in vivo- Darstellung der CCKBR- Sonde DQ- MG- 754.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Allgemeine Materialien und Geräte	26
Tabelle 2.2 Reagenzien.....	27
Tabelle 2.3 Kits	28
Tabelle 2.4 Antikörper.....	28
Tabelle 2.5 Primer für quantitative Echtzeit PCR.....	29
Tabelle 2.6 Lösungen und Master Mix	29
Tabelle 3.1 Inkubationszeit, DAB- Lösung	35
Tabelle 3.2 Konditionen Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion	36
Tabelle 3.3 Konditionen quantitative Echtzeit PCR, CYBR- Green Master Mix.....	37
Tabelle 3.4 Konditionen quantitative Echtzeit PCR, TaqMan Universal Master Mix und Sonde.....	37

Abkürzungsverzeichnis

μM Mikromolar

Abb. Abbildung

APC Adenomatous Polyposis Coli (engl.)

BMI Body Mass Index (engl.)

BRAF v-Raf murine sarcoma viral oncogene
homolog B (engl.)

CAD kanadischer Dollar

CAis Carcinoma in situ

CCKB-R Cholecystokinin- B- Rezeptor

CK1α Caseinkinase- 1α

CMMR-D Constitutional Mismatch Repair
Deficiency (engl.)

CpG- Insel Cytosin-phosphatidyl-Guanin- Insel

CTSB Cathepsin- B

CTSL Cathepsin- L

CTSS Cathepsin- S

DAB Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid

DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (engl.)

DCC Deleted in Colorectal Cancer (engl.)

ddH₂O Bidestilliertes Wasser

dH₂O destilliertes Wasser

DL Deutsche Landrasse

DNA Deoxyribonucleic acid (engl.)

DNase Desoxyribonuklease

DNS Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxynukleosidtriphosphat

FAP Familiäre Adenomatöse Polyposis

g Gramm

HE Hämatoxylin- Eosin

hg IEN high grade Intraepitheliale Neoplasie

HNPCC hereditary non- polyposis colorectal
cancer (engl.)

KRAS V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral
oncogene homolog (engl.)

krpm kilo rounds per minute (engl.)

L Liter

lg IEN low grade Intraepitheliale Neoplasie

LRP 5/6 Lipoprotein- Rezeptor 5/6

M Molar

MAPK mitogen-activated protein- kinase
(engl.)

MgCl² Magnesiumchlorid

min Minuten	RAF rapidly accelerated fibrosarcoma (engl.)
ml Milliliter	RAS rat sarcoma (engl.)
MLH1 MutL Homolog 1	RNA ribonucleic acid (engl.)
mM Millimolar	RNase Ribonuklease
mRNS messenger Ribonukleinsäure	RNS Ribonukleinsäure
MSH2 MutS Homolog 2	RT Reverse Transkriptase
MSH6 MutS Homolog 6	RT- PCR Reverse- Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion
MYC v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (engl.)	sec Sekunden
NIRF Near- Infrared- Fluorescence (engl.)	SEM standart error of the mean (engl.)
nm Nanometer	TCF/LEF T-Zell-Faktor/ Lymphoid- Enhancer- Faktor
PanIN Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (engl.)	TP53 Tumorprotein 53
PBS phosphate buffered saline (engl.)	U Unit
PCR Polymerase- Kettenreaktion	USD US- Dollar
PET Positronen Emissions Tomographie	Vgl. Vergleiche
PFA Paraformaldehyd	WT Wildtyp
pg Pikogramm	µg Mikrogramm
PI Pietrain	µl Mikroliter
PP2A Protein- Phosphatase- 2A	µm Mikrometer
qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion	

1 Einleitung

Darmkrebs ist eine häufige Todesursache in den westlichen Ländern. Im Jahr 2014 sind allein in Europa mehr als 1,5 Millionen Menschen an einem kolorektalen Karzinom verstorben (Malvezzi, Bertuccio et al. 2014). Auch in Deutschland sind die Mortalitätsraten sehr hoch. Für Männer steht die Mortalitätsrate für kolorektale Karzinome nach dem Lungenkarzinom seit Jahren an zweiter Stelle. Für Frauen nach Brust und ebenfalls Lungenkarzinom an dritter Stelle. Im Jahr 2012 starben in Deutschland somit fast 26 000 Menschen an Darmkrebs, wobei sich die Todesfälle auf 12 200 Frauen und 13 772 Männer verteilen.

Neben der Mortalität ist auch die Inzidenz bedeutend. So gab es in Deutschland im Jahr 2010 mehr als 62 000 Neuerkrankungen, 28 625 Fälle betrafen hierbei das weibliche Geschlecht, 33 802 Fälle das männliche. Dies entspricht der dritthöchsten Inzidenz aller Krebserkrankungen (Robert Koch Institut, Stand 2013).

Eine Erkrankung mit solch hohen Fallzahlen und zusätzlich einer hohen Mortalität, fordert für Behandlung und Management erhebliche Kosten. Die durchschnittlichen jährlichen medizinischen Kosten, die für einen Patienten mit einem kolorektalen Karzinom anfallen, betragen ca. 97 400 USD. Eine kanadische Studie ergab, dass für die palliative Therapie eines kolorektalen Karzinoms, pro Patient 39 614 CAD allein für die Behandlung mit Bevacizumab ausgegeben werden. Die geschätzten Lebenszeitkosten für den Einsatz von Bevacizumab, für alle, in einem Jahr mit kolorektalem Karzinom diagnostizierten Patienten, betragen somit landesweit 182 Mio CAD (Drucker, Skedgel et al. 2008).

Nicht nur die medizinischen Kosten sind bedeutend, auch die indirekten Kosten die auf eine Gesellschaft zukommen, verursacht durch Lohnausfall, Inanspruchnahme von Sozialhilfen oder ausbleibenden Steuerzahlungen, sind enorm. Hopkins et al. berechneten 2010 einen jährlichen Lohnverlust von Tumorpatienten von 18 000 CAD. Dies verursacht einen jährlichen nationalen Haushaltsverlust von 2,95 Mrd. CAD

(Hopkins, Goeree et al. 2010). Mit einem Blick auf die hohe Inzidenz von kolorektalen Karzinomen (s.o.) wird deutlich welche wichtige Rolle es hierbei spielt. Neben Patienten sind auch deren Angehörige von den indirekten Kosten einer Krebserkrankung betroffen. Eine amerikanische Studie betrachtete den inoffiziellen Pflegeaufwand von Angehörigen, in einem Zeitraum von zwei Jahren nach Diagnosestellung. Durchschnittlich 8,3 Stunden pro Tag, für einen Gesamtzeitraum von 13,7 Monaten, wurden für die Unterstützung von Patienten durch Angehörige aufgebracht. Yabroff und Kim et al. kalkulierten den für diesen Zeitraum üblichen Lohn für Pflegekräfte und kamen auf Gesamtkosten von 46 000 USD pro Patient. Die von Versicherungen gezahlten Pflegeunterstützungen betragen nur ca. die Hälfte dieser Summe (Yabroff and Kim 2009).

Interessant ist nun, in wie weit Früherkennungsmaßnahmen, wie die Koloskopie oder der Fäkal Okkulte Bluttest, im Gegensatz zu teuren Therapiekosten kosteneffektiv sind.

Van Hees et al. stellten hierfür eine Kosten- Nutzen- Analyse für die heutzutage gebräuchlichen Methoden Koloskopie, Sigmoidoskopie und Fäkal Okkultem Bluttest auf. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass für gesunde Probanden eine Koloskopie bis zu einem Alter von 83 Jahren kosteneffektiv ist. Auch für komorbide Menschen ist die Koloskopie bis ins hohe Alter kosteneffektiv. Für Patienten mit leichten Komorbiditäten liegt eine Kosteneffektivität bis zu einem Alter von 80 Jahren vor, mit schweren Komorbiditäten bis 77 Jahren (van Hees, Habbema et al. 2014). Dadurch konnte gezeigt werden, dass mit einem konsequenten Screening das Aufkommen von erheblichen Kosten für unsere Gesundheitssysteme verhindert werden kann.

Zu den Gründen, dass es überhaupt zu einem solch häufigen Auftreten von kolorektalen Karzinomen kommt, zählen neben Rauchen vor allem die unausgewogene Ernährung unserer westlichen Gesellschaft. Der

überdurchschnittliche Verzehr von rotem Fleisch und die zu geringen Mengen an Ballaststoffen in unserer Ernährung, lassen die Inzidenzen wachsen (Fu, Shrubsole et al. 2012). Okabayashi et al. konnten sogar eine direkte Korrelation zwischen steigendem BMI (engl. Body Mass Index) und erhöhtem Darmkrebsrisiko feststellen (Okabayashi, Ashrafian et al. 2012). Aber auch steigendes Lebensalter (Diamond, Enestvedt et al. 2011), genetische Disposition (Stigliano, Sanchez-Mete et al. 2014), und Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Darmkrebs (Choi and Zelig 1994).

Bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen werden drei Gruppen unterschieden. 60 % der kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch, ohne das Auftreten von Keimbahnmutationen oder familiärer Häufung. 30 % basieren auf einer familiären Häufung mit mindestens einem betroffenen Blutsverwandten, jedoch ohne das Vorkommen von klar identifizierbaren Keimbahnmutationen. Die restlichen 10 % entstehen auf Basis eines hereditären Syndroms durch Vererbung von Keimbahnmutationen in Genen, welche an der Tumorentstehung beteiligt sind (Ivanovich, Read et al. 1999).

Die meisten sporadischen kolorektalen Karzinome entstehen auf der Basis eines adenomatösen Polypen. Sie entwickeln sich über die sogenannte Adenom-Karzinom- Sequenz (Abb. 1), wie es bereits 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben wurde (Fearon and Vogelstein 1990). Hierbei führt das Zusammenspiel von mehreren Mutationen zu einer Proliferation des Kolonepithels, wodurch ein adenomatöser Polyp entsteht, welcher ein kanzerogenes Potential besitzt. Betroffen sind Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *APC* (engl. Adenomatous Polyposis Coli), *DCC* (engl. Deleted in Colorectal Cancer) oder *TP53*. Ebenfalls wichtig sind Mutationen in Protoonkogenen wie *KRAS* oder *MYC* (Vgl. Abb. 1). Auch spielen DNA- Mismatch- Reparaturproteine (auch: DNS- Basenfehlpaarungsreparatur-

Proteine) wie MLH1, MSH2 oder MSH6 eine Rolle (Leslie, Carey et al. 2002, Shussman and Wexner 2014).

Durch die Induktion der Zellproliferation formiert sich das normale Kolonepithel zu einem hyperproliferativen Epithel, durch den Verlust der Zellorganisation und Entdifferenzierung entsteht ein Adenom. Nach dem Durchbrechen der Basalmembran spricht man von einem CAis (Carcinoma in situ), nach der Invasion der Lamina Muscularis Mucosae und Infiltration der Submucosa von einem invasiven Karzinom (Abb. 1).

Wichtig ist, dass der exakte Zeitpunkt in dem ein Adenom zu einem Karzinom transformiert, nicht bestimmt werden kann. In den meisten Fällen jedoch dauert es zwischen 5 und 10 Jahren, bis sich ein adenomatöser Polyp zu einem invasiven Karzinom entwickelt (Shussman and Wexner 2014).

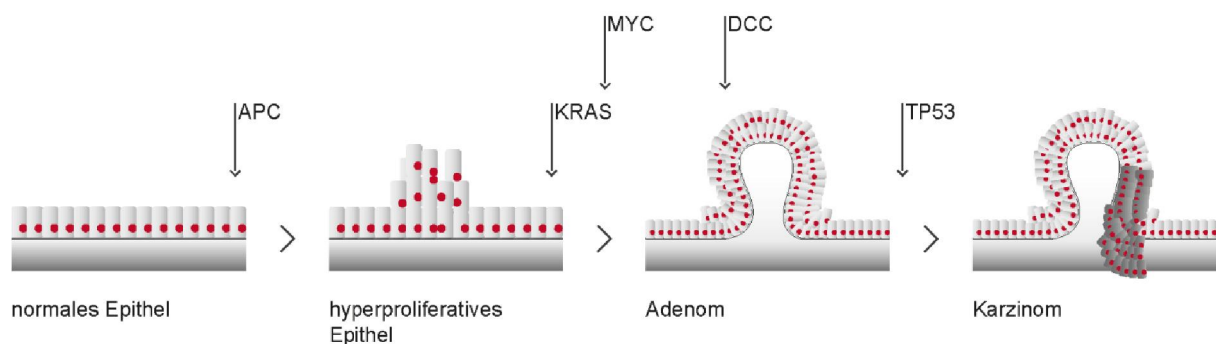


Abbildung 1: Adenom- Karzinom- Sequenz

Die Entwicklung eines invasiven Karzinoms wird indiziert durch verschiedene Mutationen, unter anderem Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *APC* (engl. Adenomatous Polyposis Coli), *DCC* (engl. Deleted in Colorectal Cancer), *TP53* oder den Protoonkogenen *KRAS*, *MYC*. Die Reihenfolge der entsprechenden Mutationen variiert und ist nicht immer Abb. 1 entsprechend. Durch Induktion der Zellproliferation formiert sich normales Epithel zu einem hyperproliferativen Epithel, durch Verlust der Zellorganisation und Entdifferenzierung entsteht ein Adenom. Nach Durchbrechen der Basalmembran spricht man von einem CAis (Carcinoma in situ), nach Invasion der Lamina Muscularis Mucosae und Infiltration der Submucosa von einem invasiven Karzinom.

Ein weiterer Entstehungsweg des sporadischen Kolonkarzinoms ist über den sogenannten "serratierten Weg" (O'Brien, Zhao et al. 2015). Es wird davon

ausgegangen, dass 20- 30 % aller sporadischen Kolonkarzinome, ausgehend von serratierten Polypen, über diesen Weg entstehen (O'Brien 2007, O'Brien, Zhao et al. 2015). Hierbei handelt es sich um die Aktivierung des RAS- RAF- MAPK- Signalweg durch eine *BRAF* oder *KRAS* Mutation. In diesen Karzinomen kommen ebenfalls CpG-Insel -Methylierungen und Mikrosatelliteninstabilitäten vor. *BRAF*- mutierte Karzinome findet man vor allem im proximalen Darm, sie haben eine starke Ausprägung der CpG- Insel- Methylierung und sind entweder mikrosatellitenstabil oder - instabil. *KRAS*- mutierte Karzinome sind eher distal lokalisiert, haben eine starke Ausprägung der CpG- Insel- Methylierung und sind immer mikrosatellitenstabil. Vor allem *BRAF*- mutierte Karzinome gehen mit einer schlechten Prognose einher (O'Brien 2007, Leggett and Whitehall 2010).

In der Entstehung von sporadischen kolorektalen Karzinomen können häufig Hypermutationen beobachtet werden. Bis zu 10 000 unterschiedliche somatische Mutationen, wie "missense"- Mutationen, "nonsense"- Mutationen, Rasterschubmutationen sowie Spleißvarianten kommen in hypermutierten Karzinomen vor. Im Vergleich zu nicht hypermutierten Karzinomen bis zu 100 mal häufiger (Ahn, Ansari et al. 2016). Als ursächlich hierfür konnte unter Anderem eine Mutation in der Polymerase ϵ mit daraus resultierendem Verlust des DNS-Korrekturlesemechanismus beschrieben werden (Kane and Shcherbakova 2014), ebenso führen Mikrosatelliteninstabilitäten zu hypermutierten Karzinomen, ausgehend von Defekten in Basenfehlpaarungsreparatur- Genen (Fishel, Lescoe et al. 1993, Eshleman and Markowitz 1996).

Generell kommen Mikrosatelliteninstabilitäten gehäuft in kolorektalen Karzinomen vor. Davon betroffen sind ca. 12,5 % sporadische Karzinome und 2,5 % Karzinome ausgehend von hereditären Syndromen (Funkhouser, Lubin et al. 2012). Mikrosatelliteninstabilität wird verursacht durch Defekte der Basenfehlpaarungsreparatur- Gene, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2*, dadurch

kommt es zum Ausbleiben von DNS- Reparaturmechanismen und zur Begünstigung der Karzinomentstehung. In sporadischen kolorektalen Karzinomen wird die Mikrosateliteninstabilität vor allem durch die Hypermethylierung von MLH1 und der dadurch resultierenden Inaktivierung verursacht (Kane, Loda et al. 1997). Mikrosateliteninstabilität, welche autosomal dominant über eine Keimbahnmutation vererbt wird, wird unter dem Begriff Lynch- Syndrom zusammengefasst. Betroffene Personen erkranken zu 80 % an einem hereditären nicht- polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC engl. hereditary non- polyposis colorectal cancer), Frauen zusätzlich zu 60 % an einem Endometriumkarzinom. Des Weiteren wird das gehäufte Auftreten von Tumoren in Blase, Niere, Gehirn, Dünndarm, Magen, Gallengängen und Ovarien beobachtet (Lynch, Smyrk et al. 1993). Wohingegen beim HNPCC nur ein Allel von der Mutation betroffen ist, sind beim Konstitutiven MMR- Defizienz (CMMR-D)-Syndrom sowohl mütterliches als auch väterliches Allel betroffen, wodurch es zu einem frühkindlichen Krebsyndrom, mit dem Auftreten von Leukämien, Hirntumoren, Assoziation zur Neurofibromatose Typ I sowie kolorektalen Karzinomen bereits in jugendlichem Alter kommt (Levi, Kariv et al. 2015).

Ein weiteres Familiäres Syndrom das zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen führt ist die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP engl. familial adenomatous polyposis). Es wird durch eine autosomal dominante Mutation im *APC*- Gen verursacht und tritt mit einer Häufigkeit von 1: 10 000 auf (Bisgaard, Fenger et al. 1994). Betroffene Patienten entwickeln bereits während der Kindheit und Jugend hunderte bis tausende kolorektale Adenome wodurch nahezu immer ein kolorektales Karzinom im Alter von 40- 50 Jahren entsteht. In ca. 8 % der Fälle kommt die FAP in einer attenuierten Form vor (AFAP) mit der Ausbildung von weniger Polypen und einem späteren Krankheitsbeginn (Knudsen, Bisgaard et al. 2003). Neben den kolorektalen Polypen können auch extraintestinale Manifestationen des Syndroms beobachtet werden. Neben weiteren malignen

Tumoren wie Hirntumoren, Schilddrüsenkarzinomen und Hepatoblastomen können Patienten zahlreiche benigne Läsionen entwickeln. Häufig sind eine kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (70- 80 %), Epidermoidzysten (50 %) und Desmoidtumore (10- 15 %), sowie das Auftreten von Osteomen (50-90 %) (Vasen, Moslein et al. 2008).

Ein wichtiger Signalweg in der Entstehung von adenomatösen Polypen durch Mutationen im *APC*- Gen ist der Wnt- Signalweg (Vgl. Abb. 2).

Das Protein β -Catenin spielt hierbei eine wichtige Rolle. Neben seiner Funktion als Zell- Adhäsionsmolekül wirkt es ebenfalls als Transkriptionsfaktor. Ohne die Bindung eines Wnt- Proteins an den 7- Transmembranrezeptor Frizzled und seinen Korezeptor LRP 5/6 (Lipoprotein- Rezeptor 5/6) wird β -Catenin phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend im 26S- Proteasom abgebaut. Hierfür ist ein Komplex, bestehend aus dem APC- Protein, GSK3 β (Glycogensynthethase- Kinase- 3 β), CK1 α (Caseinkinase- 1 α), PP2A (Protein- Phosphatase- 2A) und Axin wichtig. Nur durch einen Komplex, bestehend aus allen beteiligten Proteinen, kann β -Catenin phosphoryliert und abgebaut werden. Durch die Bindung eines Wnt- Protein an den Frizzled- Rezeptor und seinen Korezeptor LRP 5/6 ,wird das Protein Disheveled, welches im Cytoplasma lokalisiert ist, aktiviert und verhindert durch Inhibierung des APC enthaltenden Proteinkomplex die Phosphorylierung von β -Catenin. Dadurch kann β -Catenin nicht mehr im 26S- Proteasom abgebaut werden und akkumuliert im Nukleus. Folglich fungiert es nun als Transkriptionsfaktor der TCF/LEF- Familie (T-Zell-Faktor/ Lymphoid- Enhancer- Faktor)(MacDonald, Tamai et al. 2009).

Ein Zielgen dieser Transkriptionsfaktoren ist beispielsweise das Protoonkogen *MYC*, welches eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung einnimmt, in dem es an der Steigerung der Zellproliferation beteiligt ist (Herbst, Jurinovic et al. 2014).

Das normale Produkt des *APC*- Gens ist ein homodimeres Protein, 311 kDa groß und ist im basalen Pol des Kolonepithels zu finden (Grandval, Blayau et al. 2014).

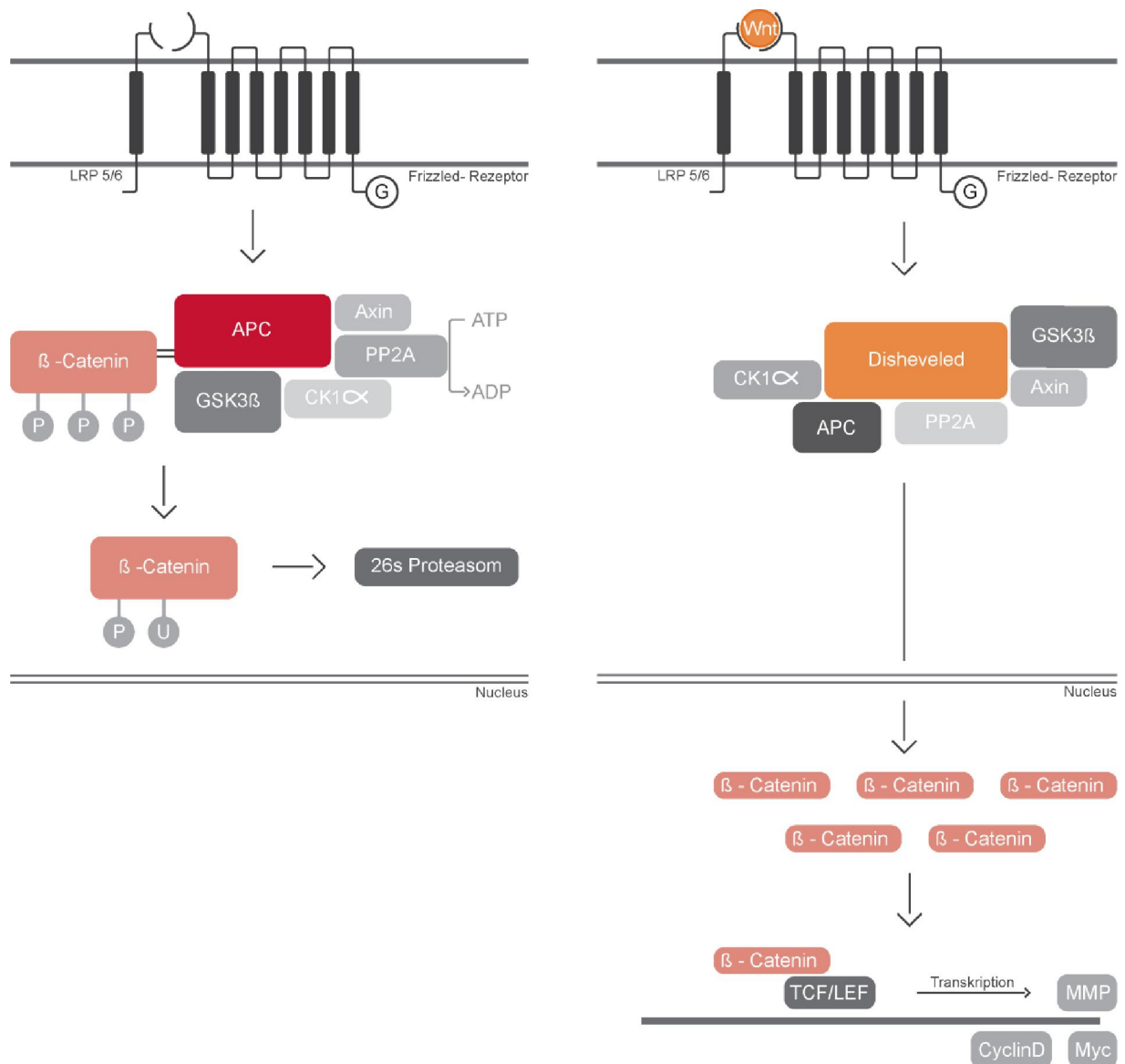


Abbildung 2: Wnt- Signalweg

Die linke Abbildung zeigt den Wnt- Signalweg ohne Aktivierung des Wnt- Liganden. β -Catenin wird durch GSK3 β (Glycogensynthethase- Kinase- 3 β) phosphoryliert, anschließend ubiquitiniert und im 26s- Proteasom abgebaut. Die rechte Abbildung zeigt den Wnt- Signalweg nach Bindung des Wnt- Liganden. Das Protein Disheveled ist aktiviert und blockiert den Proteinkomplex, bestehend aus dem APC- Protein, GSK3 β (Glycogensynthethase- Kinase- 3 β), CK1 α (Caseinkinase- 1 α), PP2A (Protein-Phosphatase- 2A) und Axin, welcher notwendig für die Phosphorylierung von β -Catenin ist. β -Catenin kann ohne Phosphorylierung nicht ubiquitiniert und im 26s- Proteasom abgebaut werden. Es akkumuliert im Nucleus und fungiert als Transkriptionsfaktor für die TCF/LEF- Familie (T-Zell-Faktor/ Lymphoid- Enhancer- Faktor). Zielproteine sind unter anderem MYC, Matrix-Metalloproteasen oder Cyclin- D, welche eine Rolle in Zellproliferation, Invasion und Metastasierung spielen.

Mutationen im *APC*- Gen, welche entweder sporadisch oder als Keimbahnmutationen wie bei der FAP vorkommen, sind sehr heterogen. Sie reichen

von kleineren Mutationen wie Punktmutationen und Deletionen bis hin zu großen, teils sehr komplexen Veränderungen wie Duplikationen und Deletionen über die Länge eines gesamten Exons oder darüber hinaus. Insgesamt sind über 3 000 unterschiedliche Mutationen bekannt (Lagarde, Rouleau et al. 2010) (Grandval, Blayau et al. 2014). Die Mutationen sind meist in der ersten Hälfte der kodierenden Sequenz des *APC*- Gens lokalisiert und führen zum Abbruch der Translation und somit zu einem verkürzten und fehlerhaften Protein (Grandval, Blayau et al. 2014). Durch das fehlerhafte *APC*- Protein kann der für den Abbau von β - Catherin benötigte Protein- Komplex β - Catherin nicht phosphorylieren, wodurch es zu dessen Akkumulation kommt. Dies führt schlussendlich zu einer unkontrollierten Proliferation von Epithelzellen des Kolons welches ein leitender Schritt zur Tumorentstehung ist (Chen and McCormick 2001). Damit es bei Individuen mit einer heterozygoten *APC*- Keimbahnmutation auch zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen kommt, muss es in den Adenomen zur weiteren *APC*- Mutation auf dem zweiten noch intakten Allel kommen, was auch als "second hit" bezeichnet wird. In Adenomen von Patienten mit einer *APC*¹³⁰⁹- Mutation, welche auch als Mutationshotspot bekannt ist und zu einer besonders schweren Ausprägung des Phänotyps führt, entsteht der "second hit" hauptsächlich durch ein Allelverlust, Verursacht durch Deletionen, Non- Disjunctionen und mitotische Rekombination (Lamlum, Ilyas et al. 1999) .

Die große Bedeutung von Früherkennungsmaßnahmen liegt nicht nur in der Senkung nationaler Kosten, wie bereits erwähnt wurde, sondern vor allem in der Senkung der Mortalität für Patienten welche an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind. Im Vergleich zu anderen gängigen Vorsorgemethoden, wie beispielsweise dem Fäkal Okkulten Bluttest, stellt die endoskopische Untersuchung die momentan sensitivste Methode zur Entdeckung von Krebsvorstufen dar (Quintero, Castells et al. 2012). Durch die Koloskopie wird nachweislich sowohl Inzidenz als auch Mortalität gesenkt.

Durch Screening mittels Endoskopie wird die Mortalität auf zwei Arten beeinflusst. Zum einen wird die Diagnose eines invasiven Karzinoms zu einem frühen, noch heilbarem Stadium gestellt, zum anderen werden Präkanzerosen entdeckt und entfernt, wodurch die Entstehung eines invasiven Karzinoms verhindert werden kann (Schoen, Pinsky et al. 2012, Nishihara, Wu et al. 2013). Zauber et al. konnten 2012 nachweisen, dass in den ersten 10 Jahren nach einer Polypektomie die Mortalität von kolorektalen Karzinomen auf ein Niveau, vergleichbar mit Personen ohne adenomatösen Befall, sinkt (Zauber, Winawer et al. 2012). Jedoch sind der Koloskopie auch Grenzen gesetzt. Eine erfolgreiche Koloskopie und somit erfolgreiche Reduktion der Mortalität ist von der Qualität des Untersuchers abhängig. Laut Kaminski et al. haben nur 14 % aller Endoskopiker eine Adenom-Detektionsrate über 20 %, welche notwendig ist, um eine Tumorentwicklung nahezu vollständig auszuschließen (Kaminski, Regula et al. 2010). Folglich können kleinste Läsionen übersehen werden, welche sich in den darauffolgenden Jahren zu invasiven Karzinomen entwickeln können.

Seit einigen Jahren beschäftigt sich deshalb die Forschung mit unterschiedlichen Methoden der Molekularen Bildgebung zur Detektion von Karzinomen im Rahmen der Krebsvorsorge. Molekulare Bildgebung ist ein Verfahren in dem mit Hilfe von signalgebender, molekularen Sonden, bestimmte Zielstrukturen in Geweben detektiert werden können. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, Veränderungen in Geweben die auf einen Krankheitswert hinweisen, frühzeitig zu erkennen.

Zur Herstellung der Sonden werden beispielsweise fluoreszierende Moleküle an ein Transportmolekül gekoppelt (Kossatz, Behe et al. 2013). Diese Transportmoleküle sind Liganden für Zielproteine in dem Gewebe, dessen Darstellung erzielt werden möchte. Mögliche Zielproteine sind hierbei Rezeptoren, Ionenkanäle, Membrantransporter sowie Enzyme (vgl. Abb. 3) (Eser, Messer et al. 2011, Haberkorn, Markert et al. 2011).

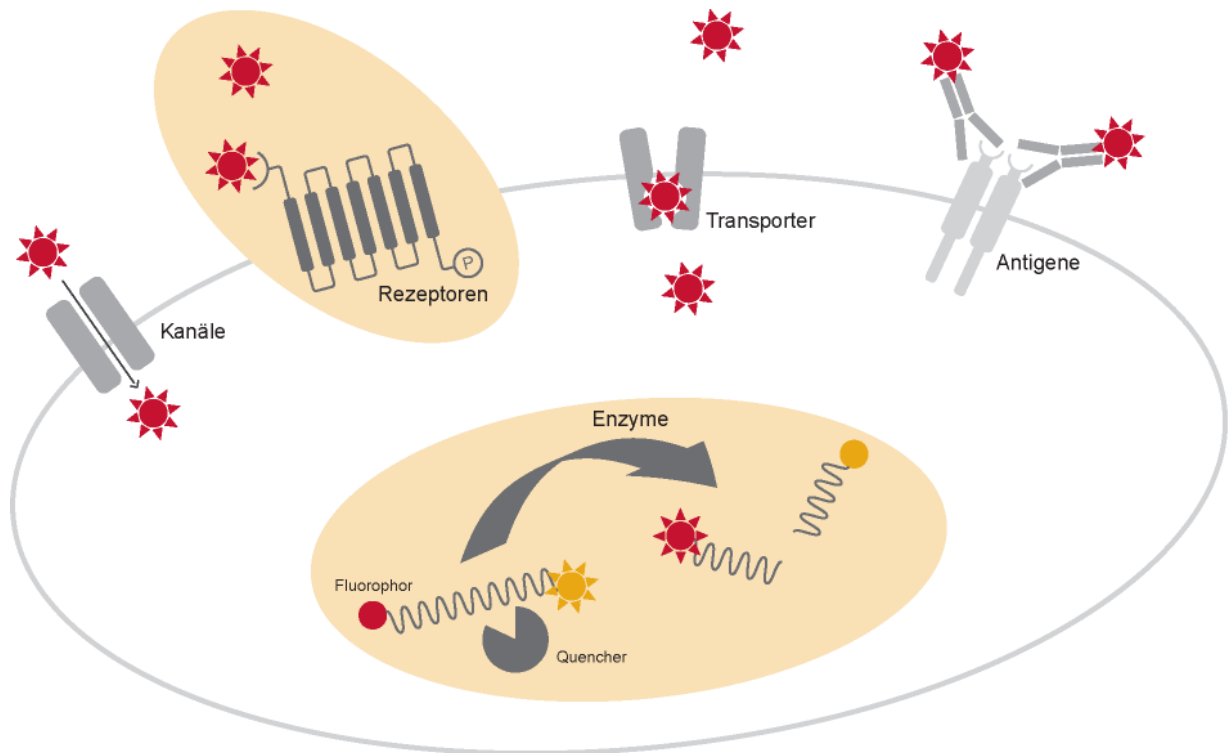


Abbildung 3: Mögliche Zielstrukturen für Molekulare Bildgebung

Als Zielstruktur für Molekulare Bildgebung eignen sich unter anderem Membrantransporter und Kanäle. Auch können Antigene als Zielstrukturen verwendet werden. Die Zielstrukturen Rezeptoren und Enzyme werden in dieser Arbeit genauer betrachtet (orange hinterlegt).

Hierbei sind Zielproteine interessant, die im kranken Gewebe überexprimiert werden oder akkumulieren, da sich somit krankes Gewebe von gesundem unterscheiden lässt. Die mit signalgebendem Molekül versehenen Liganden binden nun mit hoher Selektivität, an ihre spezifischen Zielstrukturen im Gewebe und führen somit zu einer Akkumulation des Signals. Von außen kann man dann, mittels bildgebender Verfahren, das kranke Gewebe darstellen und Veränderungen auf zellulärer Ebene schon vor dem Auftreten anatomischer Veränderungen entdecken.

Die Geschichte der Bildgebung in der Medizin begann 1895 mit der Entdeckung der Röntgenstrahlung durch W.C. Röntgen, für die er 1901 den ersten Nobelpreis für

Physik bekam (Scatliff and Morris 2014). Im Laufe der Jahre entwickelte sich die Bildgebung des menschlichen Körpers von der Darstellung anatomischer Strukturen hin zur Bildgebung funktioneller Abläufe im Körper. Ein Meilenstein hierfür war die Entdeckung der Tracermethode durch den Ungar George de Hevesy im Jahr 1943, welche die Grundlage der Molekularen Bildgebung darstellt. Er entwickelte als erster die Methode der radioaktiven Markierung von Atomen, wodurch ermöglicht wurde, chemische Reaktionen oder Transportvorgänge im menschlichen Organismus darzustellen (Gest 2005). Die Entwicklung des PET durch die amerikanischen Physiker Michel Ter-Pogossian und Michael E. Phelps 1975, stellte letztendlich die erste, funktionelle Darstellung von biochemischen Vorgängen in der Zelle dar (Ter-Pogossian, Phelps et al. 1975).

Durch Molekulare Bildgebung wird biologische Grundlagenforschung mit Radiopharmazie, Physik und Chemie verbunden, um die bestmögliche Darstellung anatomischer Strukturen und biochemischer Vorgänge im Körper zu erreichen. Durch die gute Zugänglichkeit des Dickdarms mittels endoskopischer Verfahren, eignet sich das Kolonkarzinom für die Anwendung von molekularer Bildgebung. Auch durch die große gesellschaftliche Bedeutung des Kolonkarzinoms mit seiner hohen Inzidenz und Mortalität (s.o.) erhält die Forschung zur Verbesserung der endoskopischen Früherkennung eine hohe Priorität.

2011 zeigten Eser et al. dass sich Cathepsine zur Molekularen Bildgebung von intraepithelialen Neoplasien des Pankreas, kurz PanIN (engl. Pancreatic Intraepithelial Neoplasia), eignen (Eser, Messer et al. 2011). Hierfür wiesen sie die Cathepsine B, H, L und S mittels Immunhistochemie nach. Des weiteren konnten sie PanIN mit der Cathepsin-aktivierbaren Sonde ProSense detektieren und eine Steigerung des Fluoreszenzsignals, von low grade PanIN zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas, feststellen. Signale konnten sowohl ex vivo in

Gefrierschnitten, als auch *in vivo* mittels konfokaler Lasermikroskopie detektiert werden.

Bei Cathepsinen handelt es sich um lysosomale, proteolytische Enzyme, die eine bedeutende Rolle in Geweben mit erhöhtem Zellumsatz, beispielsweise Karzinomen, spielen. Die Fähigkeit von Tumorzellen, verschiedene Gewebe zu infiltrieren und zu metastasieren, beruht unter anderem auf einer erhöhten Expression von Proteinasen, zu denen auch die Cathepsine zählen. Proteinase wirken bei der Abtrennung einzelner Tumorzellen vom Haupttumor mit und sind somit an der Invasion des tumorumgebenden Gewebes beteiligt. Auch ermöglichen sie den Kontakt von Tumorzellen mit Blut und Lymphgefäßen, welches ein wichtiger Schritt der Metastasierung ist (Talieri, Papadopoulou et al. 2004, Kuester, Lippert et al. 2008). Dies wird ihrer Funktion als Endo und Exopeptidasen zugeschrieben. Sie degradieren intrazelluläre und endozytierte Proteine, sowie Proteine der extrazellulären Matrix. Auch haben sie proteolytische Effekte auf Proteine von Basalmembranen und interstitiellem Stroma, wodurch Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ermöglicht wird (Guzinska-Ustymowicz, Zalewski et al. 2004, Herszenyi, Barabas et al. 2014) .

Die Familie der Cathepsine ist groß. Für die Forschung der Molekularen Bildgebung bisher wichtige Cathepsine sind die Cathepsine B, H, L und S, die zu den Cysteinproteasen gezählt werden, und Cathepsin D, welches eine Asparaginprotease ist (del Re, Shuja et al. 2000, Marten, Bremer et al. 2002). Einige Arbeitsgruppen konnten bereits im Mausmodell nachweisen, dass auch bei kolorektalen Adenomen eine Überexpression verschiedener Cathepsine vorhanden ist. Diese konnten sie mit ProSense detektieren, wie es Eser et al. beim Pankreas taten (Gounaris, Tung et al. 2008, Zhang, Morgan et al. 2008). Auch zeigen Ergebnisse aktueller Publikationen, dass die Menge an akkumulierenden Cathepsinen mit dem Malignitätsgrad des Darmepithels korreliert. Beispielsweise konnten Talieri et al. bereits 2004 eine

Steigerung des Cathepsin B- Levels von Adenomen zu Karzinomen feststellen (Talieri, Papadopoulou et al. 2004). Neben vielen Ergebnissen zur Expression von Cathepsinen, die auf einem Mausmodell basieren, wurden auch Arbeiten mit humanem Gewebe durchgeführt. 2010 untersuchten Chan et al. Tumorproben von 558 Männern und Frauen mittels Immunhistochemie und konnten hierbei eine Expression von Cathepsin B in 82 % der Fällen feststellen (Chan, Baba et al. 2010). Auch Kirana et al. stellten 2012 eine Überexpression von Cathepsin D in 119 humanen kolorektalen Karzinomen fest (Kirana, Shi et al. 2012).

Obwohl es schon viele Forschungsergebnisse zur Expression von Cathepsinen in kolorektalen Karzinomen gibt, größtenteils mit dem Ergebnis, dass sich Cathepsine als Zielstruktur für molekulare Marker eignen, ist dennoch Raum für Ergänzungen. Neben viel Literatur zu Cathepsin B und Cathepsin D, gibt es nur vereinzelt Ergebnisse zu anderen Cathepsinen wie H, L oder S. Die meisten Arbeitsgruppen wählten als Methodik Westernblot und Immunhistochemie zur Untersuchung der Cathepsine (del Re, Shuja et al. 2000, Chan, Baba et al. 2010, Kirana, Shi et al. 2012), nur wenige, wie beispielsweise Marten et al., benutzen die Methode quantitative Echtzeit- PCR. Interessant ist es nun, neben den viel- untersuchten Cathepsinen B und D, auch die Expression der Cathepsine H, L und S in Adenomen zu betrachten. Vor allem die Untersuchung der Expression auf quantitativer Ebene, mittels quantitativer Echtzeit- PCR wurde, soweit bekannt, noch von keiner Forschungsgruppe für eine solch große Gruppe von Cathepsinen durchgeführt.

Eine weitere, interessante Zielstruktur für Molekulare Bildgebung, ist der CCKB-Rezeptor (Cholezystokinin- B- Rezeptor). Beim CCKB- Rezeptor handelt es sich um einen G- Protein gekoppelten, 7- Transmembranrezeptor für Gastrin und Cholezystokinin, der in vielen Tumorgeweben vorkommt (Kossatz, Behe et al. 2013) und durch die Aktivierung verschiedener Signalwege an der Tumorentstehung beteiligt ist (Abb. 4). Unter anderem konnte er im medullären Schilddrüsenkarzinom,

kleinzelligen Lungenkarzinom, in Astrozytomen oder im Ovarialkarzinom festgestellt werden (Reubi, Schaer et al. 1997).

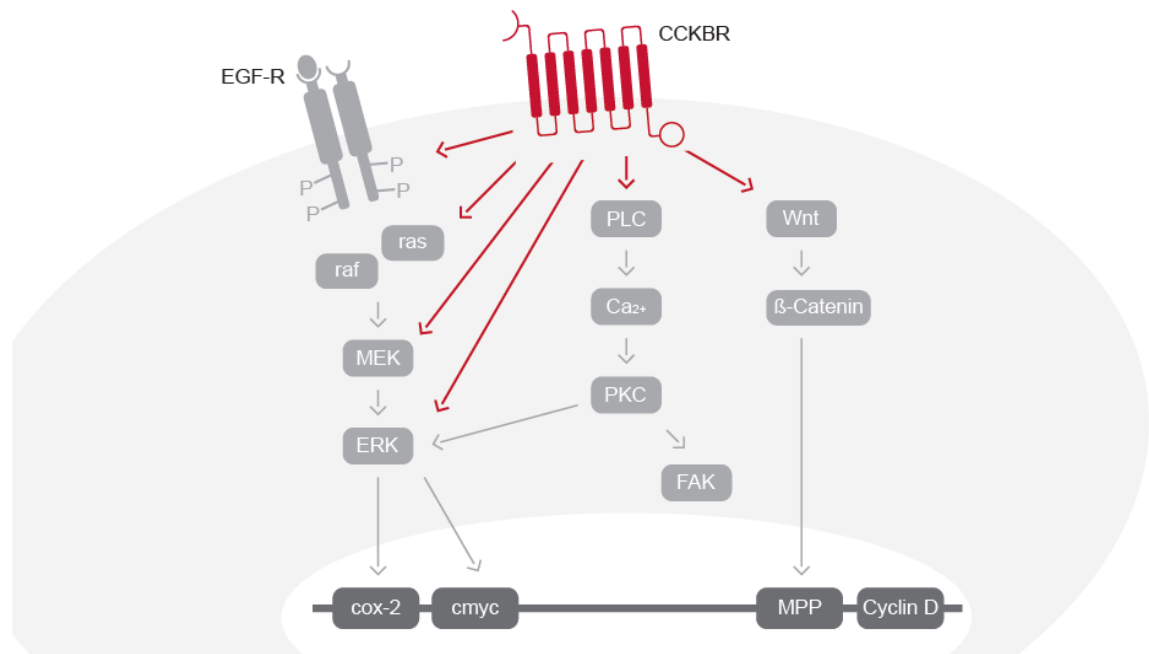


Abbildung 4: Die Rolle des CCKB- Rezeptors in der Tumorentstehung

Der CCKB- Rezeptor (CCKBR) aktiviert ligandenunabhängig den EGF-Rezeptor (eng. Epithelial-Growthfactor- Rezeptor) und den MAP-Kinase-Signalweg (engl. Mitogen- Activated- Protein). Durch die Aktivierung des Cox2- Promoters, sowie cMYC kommt es zur Stimulierung des Zellwachstums. Auch führt der CCKB- Rezeptor zu einer Aktivierung der FAK (engl. Focal Adhesion Kinase) welche in die Progression von malignen Veränderungen involviert ist. Durch die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) kommt es zur Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat zu Inositoltriphosphat und Diacylglycerol, zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium und Aktivierung der Proteinkinase- C (PKC). Diese wirkt stimulierend auf FAK als auch auf den MAP- Kinase- Signalweg. Außerdem fördert der CCKB-R die Aktivierung des Wnt- Signalweges, welcher über die Akkumulation von beta- Catherin, zu einer Überexpression von Matrix-Metalloproteasen oder Cyclin- D führt, welche eine Rolle in Zellproliferation, Invasion und Metastasierung spielen (Guo, Cheng et al. 2002, Yu, Tong et al. 2006, Huang, Ansorge et al. 2007, Willard, Lajiness et al. 2012).

Auch in humanen kolorektalen Karzinomen konnte der CCKB- Rezeptor nachgewiesen werden (Chao, Tallman et al. 2005). Schmitz et al. untersuchten 79 humane kolorektale Karzinome und konnten eine Überexpression von CCKB-

Rezeptoren in 38 % der Karzinome, jedoch nur in 13 % der normalen Mukosa feststellen (Schmitz, Otte et al. 2001). Smith et al. konnten auch eine Expression des CCKB- Rezeptors in humanen Adenomen des Dickdarms feststellen. 96 % aller untersuchten Adenome wiesen eine Expression des Rezeptors auf, wohingegen in der normalen Kolonmukosa kein Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Smith and Watson 2000).

Vor allem die Tatsache, dass der CCKB- Rezeptor in Adenomen des Dickdarms, jedoch nicht in der normalen Darmschleimhaut vorkommt, macht den CCKB- Rezeptor zu einer idealen Zielstruktur für Molekulare Bildgebung. Kossatz et al. entwickelten deshalb eine fluoreszierende Sonde, mit einer Wellenlänge nahe des Infrarotlichts, die den CCKB- Rezeptor detektieren kann. Die DQ-MG 754- Sonde besteht aus dem Transportmolekül Minigastrin, eines aus 7 Aminosäuren bestehendem Peptid, welches spezifisch an den CCKB- Rezeptor bindet. Außerdem besteht sie aus einem signalgebendem Teil, einem hemicyanin fluoreszierendem Farbstoff namens DY-754 (Kossatz et al. 2013) (Abb. 5). Kossatz et al. konnten im Zellmodell zeigen, dass die Sonde eine sehr spezifische Bindungsaffinität aufweist und eine starke Bindung mit Tumorzellen, jedoch keine Bindung mit Wildtyp - Zellen eingeht. Auch in vivo konnte keine Anfärbung von normalem Darmgewebe festgestellt werden. In der Endoskopie kann somit eine gute Bildgebung ohne unspezifisches Hintergrundsignal gewährleistet werden.

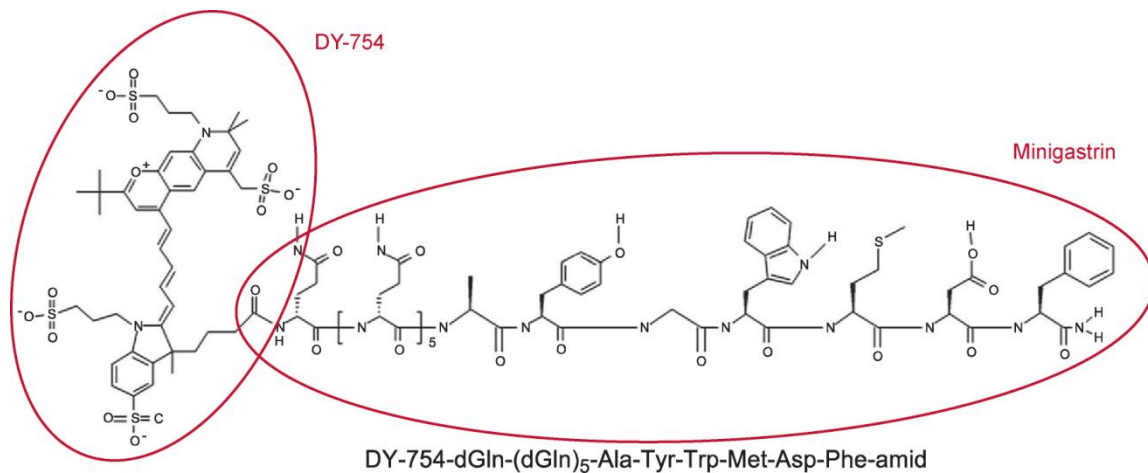


Abbildung 5: Chemische Struktur der Sonde DQ-MG 754

Die CCKB- Rezeptor spezifische Sonde, mit einer Wellenlänge nahe dem Infrarotlicht, besteht aus einem 7 Aminosäuren langem Transportmolekül, Minigastrin (rechter Kreis) und dem hemicyanin fluoreszierenden Farbstoff DY- 754 (linker Kreis). Die Sonde ist hydrophil aufgrund von 6 Glutamin am N- Terminus des Peptids und den 4 negativ geladenen Sulfonatgruppen des Farbstoffs. Dadurch wird die Sonde hauptsächlich renal eliminiert, nur ein geringer Teil hepatisch. Es kommt dabei zu keiner Schädigung der Niere, solange kein radioaktives Material verwendet wird. Abbildung aus Biomaterials Vol. 34, April 2013, Kossatz et al.

Wie bereits erwähnt, existieren schon einige Forschungsergebnisse zur Molekularen Bildgebung des kolorektalen Karzinoms und Adenomen des Dickdarms. Neben Studien mit humanem Gewebe, sind häufig verwendete Tiermodelle verschiedene APC- Maus- und Ratenmodelle. Durch unterschiedliche Mutationen im APC- Gen kommt es im betroffenen Individuum zur Entwicklung einer Polyposis im Darm, welches die Grundlage zur Forschung an kolorektalen Adenomen und Karzinomen darstellt (Zeineldin and Neufeld 2013). Jedoch weisen Tiermodelle basierend auf Nagetieren, einige Limitationen auf. Einerseits entwickeln Mäuse vor allem im Dünndarm Polypen, was für die Forschung an kolorektalen Karzinomen und insbesondere für die endoskopische Bildgebung nicht ideal ist, da der Dünndarm bei Mäusen endoskopisch nicht zugänglich ist. Außerdem verhindert die oft kurze Lebensspanne von Mäusen die Entwicklung des gesamten Phänotyps. So kommt es beispielsweise nur selten zur Entstehung eines invasiven Karzinoms, da die

betroffene Maus das notwendige Alter nicht erreicht (Moser, Pitot et al. 1990, Boivin, Washington et al. 2003).

Flisikowska et al. entwickelten deshalb ein Tiermodell, basierend auf Schweinen mit einer *APC*- Mutation. Sie züchteten Schweine mit einer *APC*^{1311/+} - Mutation, welches dem humanen Mutationshotspot *APC*¹³⁰⁹ entspricht. Hierzu wurde im Exon 17 der Schweine ein Stopcodon an der Stelle von Codon 1311 eingesetzt, welches der humanen Mutation von Codon 1309 entspricht, da die *APC*- Gen- Sequenz des Schweins an der Stelle des Codons 1246 zwei zusätzliche Aminosäuren aufweist und dies für darauffolgende Codon- Nummern angepasst wurde (Abb. 6) (Flisikowska, Merkl et al. 2012).

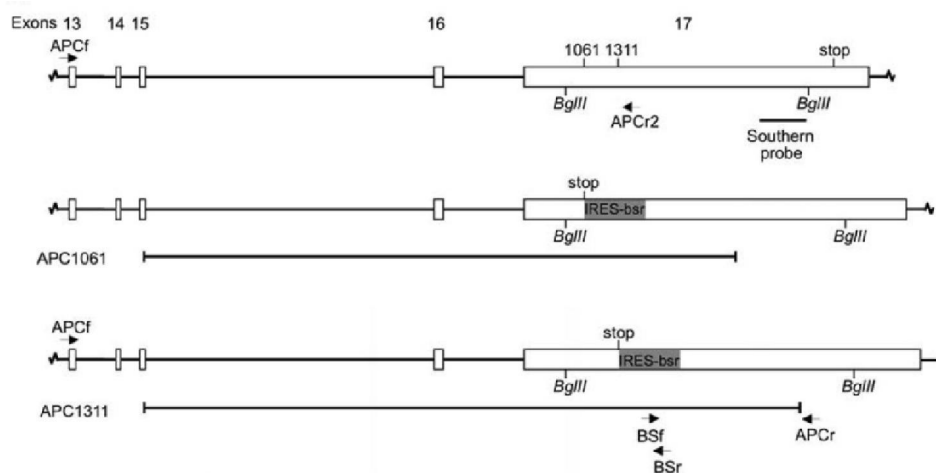


Abbildung 6: Veränderungen im *APC*- Gen der Schweine

Gezeigt ist das Schema der Veränderungen im *APC*- Gen der Schweine in der 3'- Region des *APC*- Gens. Zu sehen sind die Exons, ebenso das betreffende Exon 17, die Codons 1061 und 1311 und das eingefügte Stopcodon. Auch gezeigt sind "internal ribosomal entry site" IRES- bsr als Markergen und die BglIII Restriktionsstellen.

Vergleiche im humanen und porcinen *APC*- Gen haben gezeigt, dass das porcine *APC*- Gen im Codon 1246 zwei zusätzliche Aminosäuren enthält weshalb alle danach aufgeführten Codon- Nummern angepasst wurden.

Mittlere Reihe: Die durch den Vektor *APC*¹⁰⁶¹ Veränderte Region im *APC* -Gen. Der vom Vektor eingeschlossene Bereich ist durch den unteren Balken markiert. Untere Reihe: Die durch den Vektor *APC*¹³¹¹ veränderte Region im *APC* - Gen. Der vom Vektor eingeschlossene Bereich ist durch den unteren Balken markiert. Abbildung aus *Gastroenterology* Vol. 143, No.5, November 2012, Flisikowska et al.

Bei Schweinen dieses Genotyps kommt es zu einer starken Ausprägung des Phänotyps. Im Vergleich hierzu entwickelten die *APC^{1061/+}* - Schweine einen weitaus geringer ausgeprägten Phänotyp, welcher gleich der humanen Mutation dieses Genlocus ist. Der Darm von Wildtyp Tieren war in jedem Fall frei von Polypen.

Zusammenfassend zeigt ein *APC*- Schweinmodell einige Vorteile für die Forschung der Molekularen Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms. Durch die starke Ausprägung des Phänotyps, der Lokalisation der Polyposis, sowie durch vergleichbarer Histologie kann den Voraussetzungen im menschlichen Organismus optimal nachempfunden werden.

Durch die hohe Inzidenz, Mortalität und die hohen Kosten, die das kolorektale Karzinom verursacht, nehmen Früherkennungsmaßnahmen einen immer höheren Stellenwert in der westlichen Gesellschaft ein. Eine Verbesserung und Optimierung vorhandener Methoden zur Früherkennung sind somit von großer Bedeutung. Nur so können Mortalität und Inzidenz weiter gesenkt (Sharma, Gupta et al. 2014) und zusätzlich Kosten gespart werden. Molekulare Bildgebung weist hier ein hohes Potential auf um Adenom- Detektionsraten bei der Endoskopie zu verbessern und die Mortalität weiter zu senken.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die eingehende Charakterisierung des *APC*- mutierten Kolonkarzinommodells beim Schwein und die Identifizierung von potentiellen Biomarkern für die molekulare Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms.

2 Materialien

2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

Tabelle 2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

Material	Herkunft
96- Platte Klebefolie, MicroAmp, optical Adhesive Film DNA/ RNA/ RNase Free	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Destilliertes Wasser	B. Braun AG, Melsungen
Echtzeit-PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Einbettkassetten	AMP, Stensved, DK
Einbettssystem, EG 1150	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eindeckmedium für Gefrierschnitte, Fluoreszenz	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Eindeckmedium, Pertex	Medite GmbH, Burgdorf
Fluoreszenzmikroskop, Imager M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Homogenisator Silent Crusher M	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Kryo-Medium für Gefrierschnitte, Tissue-Tek O.C.T. compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL
Kryotom, Cryostat Microm HM560	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Magnetrührer IKAMAG	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom, HM 355S Automatic Microtome	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrowelle	Siemens AG, München
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Odyssey CLx Infrared Imaging System	Li-Cor Biotechnology, Lincoln, USA
Paraffin- Streckbad, Microm SB80	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm	BEMIS COMPANY, Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
PCR- Maschine, Flexcyler	Analytik Jena AG, Jena
PCR- Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg; Brand GmbH + Co.KG, Wertheim
pH-Meter pH 521	WTW GmbH, Weilheim
Pipettenspitzen steril	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen unsteril	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe

Material	Herkunft
Präzisionswaage Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
qPCR- Platten, MicroAmp, Fast Optical 96-Well	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
qPCR- Software, StepOneSoftware 2.3	GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
QIAshredder- Homogenisator	Qiagen GmbH, Hilde
Reaktionsgefäß 1.5 und 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Rotiabo- Faltenfilter 50s, 210mm	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tischzentrifuge, Galaxy Mini	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Beverly, MA, USA

2.2 Reagenzien

Tabelle 2.2 Reagenzien

Reagenz	Herkunft
Antigen Unmasking Solution, Citrat basiert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CCKB-Rezeptor- Sonde, DQ-MG-754	Peptide Specialty Laboratories (PSL) GmbH, Heidelberg
DAPI- Diamidin- Phenylindol (Wellenlänge 461 nm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D(+)-Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eosin	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol 100 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 96 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol 80 %	Pharma Aldenhoven, GmbH & Co. KG, Aldenhoven
Hasen- Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd, phosphatgepuffert 4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phalloidin (Wellenlänge 549 nm)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phosphatepufferte Salzlösung	GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
RNA- stabilisations Reagent (RNAlater)	Qiagen GmbH, Hilde
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilde
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilde

Reagenz	Herkunft
Roticlear Xylol-Ersatz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serum- Albumin, Rind	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TaqMan Reverse- Transkription Reagenzien	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan universal Master Mix, ABsolute blue QPCR Rox Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA
Wasserstoffperoxid	Merck KgaA, Darmstadt
Ziegen- Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.3 Kits

Tabelle 2.3 Kits

Kit	Herkunft
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC- Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilde

2.4 Antikörper

Tabelle 2.4 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Katalognummer
CCKB-R	1: 600	Abnova GmbH c/o EMBLEM, Heidelberg	PAB17158
Cathepsin- L	1: 50	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	611084
Cathepsin- H	1: 40	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	AF1013
Cathepsin- B	1: 200	abcam, Cambridge, UK	ab58802
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Katalognummer
Biotinyliert Anti- Hase	1: 500	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	BA-1000
Biotinyliert Anti- Maus	1: 500	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	BA-9200
Biotinyliert Anti- Ziege	1: 500	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	BA-5000

2.5 Primer

Alle Primer wurden von Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg synthetisiert.

Tabelle 2.5 Primer für quantitative Echtzeit PCR

Quantitative Echtzeit PCR		
Name	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
Cathepsin- B	ACT GCC CGA CCA TCA AAG AG	GGA TGC AGA TCC GGT CAG AG
Cathepsin- D	GGC GGC ATT GAC TCC AAG TA	GAC TCA CTG GTC CAT GTG GA
Cathepsin- H	CCA GGC CTT CGA GTA CATC C	TAT CGG GCT GGA ACT TGC AG
Name	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
Cathepsin- L	TTG GTG GTT GGC TAT GGC TT	CCG TTC CAG CCC CAT TCT
Cathepsin- S	CCC ACT GTC ACG CAT TCT TTG	TCC CAG TGA CGA TCC AAG GT
Cyclophilin	ATC TTG TCC ATG GCA AAT GCT	GAC CAC ATG TTT GCC ATC CAA

2.6 Lösungen und Master Mix

Tabelle 2.6 Lösungen und Master Mix

Lösung	Zusammensetzung
A- Lösung	PBS Serum Albumin, Rind 3 %
ABC- Lösung	2,5 ml PBS 1 Tropfen (25 µl) Lösung A 1 Tropfen (25 µl) Lösung B
Antidemaskierungslösung 0,94 % (1L)	9,4 ml Antigen Unmasking Solution, Citrat basiert 990 ml ddH ₂ O
CCKB-Rezeptor- Inkubationslösung	CCKB-Rezeptor- Sonde DQ-MG-754 in PBS (5 mM)
DAB- Lösung	2,5 ml ddH ₂ O 1 Tropfen (25 µl) Puffer 1 Tropfen (25 µl) Wasserstoffperoxid 2 Tropfen (50 µl) Diaminobenzidin
DNase- Inkubationsmix	10 µl DNase Stock- Lösung 70 µl RDD Puffer
PFA ohne Methanol 4 % (100 ml)	Bei 60° 50 ml ddH ₂ O 4 g PFA Filtern 10 ml PBS (95,5 g/L) 40 ml ddH ₂ O

Master Mix	Zusammensetzung	
Reverse Transkription, Master Mix	Komponente	Endkonzentration
	10 x TaqMan RT Puffer	1 x
	MgCl ₂ (25 mM)	5.5 mM
	dNTP- Mix (10 mM)	500 µM
	Primer (50 µM)	2.5 µM
	RNase Inhibitor (20 U/ µl)	0.4 U/ µl
	Multiscribe RT (50 U/ µl)	1.25 U/ µl
	RNA	10 pg- 2 µg
Wasser RNase frei	auf 100 µl auffüllen	
Echtzeit PCR- Master Mix	Komponente	Volumen pro Reaktion
	SYBR- Green	12,5 µl
	Primer- vorwärts, rückwärts (10 µM)	je 0,25 µl
	ddH ₂ O	7 µl
	cDNS	20 µl
Echtzeit PCR, TaqMan- Master Mix	Komponente	Volumen pro Reaktion
	TaqMan Universal Master Mix	10 µl
	Primer- vorwärts, rückwärts (10 µM)	je 0,6 µl
	Sonde (4 µM)	0,75 µl
	cDNS	5,00 µl
	ddH ₂ O	3,05 µl

3 Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Methoden anhand dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.

3.1 Tiermodell und Extraktion von Gewebe

3.1.1 Schweinemodell, $APC^{1311/+}$, $APC^{1311/+}$ und $TP53^{R167H/+}$, $APC^{1311/+}$ und $KRAS^{G12D/+}$

Das verwendete Tiermodell basiert auf einer $APC^{1311/+}$ Mutation, dem porcinen ortholog der humanen APC^{1309} Hotspotmutation, die in Patienten mit einer Familiären Adenomatosis Polyposis (FAP) sehr häufig vorkommt. Hierzu wurde im Exon 17 der Schweine ein Stopcodon an der Stelle von Codon 1311 mittels homologer Rekombination inseriert, welches der humanen Mutation von Codon 1309, entspricht, da die APC - Gen- Sequenz des Schweins an der Stelle des Codons 1246 zwei zusätzliche Aminosäuren aufweist und alle darauffolgende Codon- Nummern angeglichen wurden (Flisikowska, Merkl et al. 2012). Die APC -mutierten Schweine entwickeln analog zur humanen Erkrankung eine adenomatöse Polyposis des Dickdarms.

Weitere Tiermodelle hatten, zusätzlich zur $APC^{1311/+}$ -Mutation, eine $TP53^{R167H/+}$ - oder $KRAS^{G12D/+}$ - Mutation.

Die $TP53^{R167H/+}$ - Mutation entspricht der humanen $TP53^{R175H/+}$ - Mutation, hierfür wurden ein Transkriptionsterminations- Signal (LSL- Kasette) in Intron 1 und ein Stopcodon in Exon 5, welche die onkogene Aktivierungsmutation R167H kodiert, eingesetzt. Das Allel $TP53^{LSLR167H}$ verursacht nun eine verminderte Expression von $TP53$. Durch Cre- Rekombinase- gesteuerte Entfernung der LSL- Kasette werden $TP53$ -R167H mRNA und Protein exprimiert (Leuchs, Saalfrank et al. 2012).

Analog hierzu wurde auch für die $KRAS$ - Mutation eine LSL- Kasette in Intron 1 eingesetzt sowie eine G zu A Nukleotid- Substitution in Exon 2, wodurch ein

Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparagin in Codon 12 (G12D) stattfand. Durch Cre- abhängige Exzision der LSL- Kasette konnte auch hier ein Allel $KRAS^{LG12D}$ generiert werden, welches KRAS exprimiert (Li, Edlinger et al. 2015).

Die Schweinerassen waren entweder Deutsche Landrasse, oder eine Kreuzung zwischen Deutscher Landrasse und Pietrain. Das Tiermodell wurde zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere, des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, der Technischen Universität München, unter der Leitung von Prof. Angelika Schnieke.

Alle Tierexperimente verliefen unter der Genehmigung der Regierung Oberbayern und wurden, entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und den Regeln der Europäischen Union zur Haltung und Nutzung von Versuchstieren, durchgeführt.

3.1.2 Extraktion von Gewebe

Zur Gewebeentnahme wurden die Schweine zuerst intramuskulär anästhesiert, anschließend wurde die Narkose intravenös, über einen Zugang am Ohr, vertieft (Abb. 7). Danach wurden sie gewogen und Auffälligkeiten im Gesundheitszustand dokumentiert. Zur Vorbereitung der Untersuchung wurde der Darm mit Wasser gut gespült und von Fäzes gereinigt, um dem Untersucher eine freie Sicht zu ermöglichen. Bei jeder Untersuchung wurden die Schweine endoskopiert und Proben der Adenome, sowie normaler Mucosa mit einer Polypektomieschlinge entnommen. Zusätzlich wurden die Polypenzahl und die genaue Anzahl der extrahierten Gewebeproben dokumentiert. Auch wurden Foto- und Videomaterial zur weiteren Dokumentation angelegt.



Abbildung 7: Durchführung der Probengewinnung

- a) Legen einer Venenverweilkanüle zur anschließenden intravenösen Vertiefung der Narkose.
 b) Reinigung des Darmes mit Wasser zur Vorbereitung der Untersuchung.
 c) Durchführung der Endoskopie mit humanem Endoskop.

3.2 Histologie

3.2.1 Gewebefixation und Anfertigung von Gewebeschnitten

Die gewonnenen Gewebeproben aus den Schweinen wurden für 24 Stunden in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit der Entwässerungsmaschine ASP 300, über Nacht, entwässert, danach mit Paraffin fixiert. Alle fertigen Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Mit dem Mikrotom wurden 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einer maximalen Lagerungszeit von 10 Tagen gefärbt.

Die Gewebeschnitte wurden in je zweimal 5 Minuten Roticlear entparaffinisiert. Anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Jeweils zweimal 3 Minuten 100 %, 96 %, 80 % Ethanol, dann dH₂O. Danach wurden die Gewebeschnitte für 20 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt. Nach 10 minütigem Waschen unter fließendem Leitungswasser für 15 Sekunden in Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, mit je zweimal 3 Minuten 80 %, 96 % und 100 % Ethanol. Nach Inkubation in je zweimal 5 Minuten Roticlear wurden die Gewebeschnitte mit Pertex- Eindeckmedium eingedeckt.

3.2.2 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten

Die Gewebeschnitte wurden entparaffinisiert und rehydriert wie in 3.2.1 beschrieben. Gewebeschnitte wurden zunächst antigendemaskiert indem sie mit Antigendemaskierungslösung auf Zitratbasis (Tabelle 2.6), für 15 Minuten in einer Mikrowelle aufgekocht wurden. Ca. 3 Minuten bei 800 W und 12 Minuten bei 360 W. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und mit dH₂O gewaschen.

Zum Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte einmal mit Wasser und zweimal mit PBS gewaschen. Danach mit 5 % Serum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Hierbei wurde das Serum der gleichen Spezies gewählt wie der Wirt des sekundären Antikörpers. Zusätzlich wurde Avidin aus dem Avidin/ Biotin- Block Kit hinzugefügt.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der primäre Antikörper in 3 % Serum bei 4 °C über Nacht inkubiert (Tabelle 2.4). Zusätzlich wurde Biotin aus dem Avidin/ Biotin- Block Kit hinzugefügt. Durch erneutes, dreimaliges Waschen mit PBS wurde überschüssiger primärer Antikörper entfernt. Der biotinylierte sekundäre Antikörper, in der Verdünnung 1: 500 (Tabelle 2.4) ,in 3 % Serum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Verstärkung und Spezifizierung der Färbung wurden, nach dreimaligem Waschen mit PBS, die Schnitte mit ABC- Lösung für 30 Minuten inkubiert. Anschließend mit DAB- Lösung (Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) versetzt, bis eine spezifische Braunfärbung sichtbar wurde. Folgende Zeiten haben sich hierfür als ideal erwiesen:

Tabelle 3.1 Inkubationszeit, DAB- Lösung	
Antikörper	Zeit
CCKBR	40 sec.
Cathepsin B	30 sec.
Cathepsin H	1,5 min.
Cathepsin L	1,5 min.

Zuletzt wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und eingebettet, wie in 3.2.1 beschrieben.

3.2.3 Auswertung und Dokumentation

Alle HE- Färbungen wurden bezüglich des histologischen Malignitäts- Grading beurteilt. Hierzu wurden sie in low grade Intraepitheliale Neoplasie (lg IEN), high grade Intraepitheliale Neoplasie (hg IEN), cacinoma in situ (CAis) und Normale Mukosa eingeteilt.

Die Schnitte wurden mittels dem Mikroskop Axio Imager. A1, der Kamera AxioCam HRc und der Software AxioVision 4.8 fotografiert und dokumentiert. Hierzu wurden, pro ausgewähltem Gewebeschnitt, Bilder der Vergrößerungen 10 x, 20 x und 40 x angefertigt.

3.3 RNS- Analyse

3.3.1 RNS Isolation und Reverse Transkription

Die Puffer RW1, RPE und RLT entstammen dem Rneasy Mini Kit der Firma Quiagen, die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt.

Zur RNS Isolation wurden die Gewebeproben in RNA- Later transportiert und am selben Tag weiterverarbeitet. Hierzu wurden die Gewebeproben zusammen mit RLT Puffer und Mercaptoethanol homogenisiert. Dafür wurde das Verhältnis RLT Puffer/

Mercaptoethanol 1: 100 verwendet. Anschließend wurde das gewonnene Lysat (600 μ l) mit Hilfe einer QIAshredder Spin- Säule, durch 2 Minuten zentrifugieren bei 13,2 krpm, noch feiner homogenisiert. Zu dem gewonnenen Lysat wurde nun, im Verhältnis 1: 1, 70 % Ethanol hinzugefügt und gut vermischt. Anschließend wurden 350 μ l RW1 Puffer hinzugefügt, und für 15 Sekunden bei 10 krpm zentrifugiert. Zur Elimination der Verunreinigung durch DNS wurden 80 μ l DNase Inkubationsmix (Tabelle 2.6) hinzu pipettiert und für 15 Sekunden bei 10 krpm zentrifugiert. Danach wurden 500 μ l RPE Puffer hinzugefügt und erneut für 15 Sekunden bei 10 krpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, das zweite Mal jedoch für 2 Minuten zentrifugiert. Um die mRNA zu eluieren, wurden 30- 50 μ l RNase freies ddH₂O hinzugefügt, 1 Minute inkubiert, danach für 1 Minute bei 13,2 krpm zentrifugiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNS wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND- 1000 bestimmt. Hierfür wurden pro Probe mindestens zwei Werte gemessen, die nicht mehr als 50 ng/ μ l voneinander abgewichen sind und deren Mittelwert bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die RNS- Proben bei - 80 °C gelagert.

Zur Herstellung von 100 μ l cDNA wurden 2 μ g RNS verwendet. Hierzu wurden RNS, RNase freies ddH₂O und Reverse Transkriptions Master Mix zusammengefügt (Tabelle 2.6). Die RT- PCR wurde unter folgenden Konditionen ausgeführt:

Tabelle 3.2 Konditionen Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion	
Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
48 °C	1 h
95 °C	5 min
4 °C	Ende

3.3.2 Quantitative Echtzeit- PCR

Zur Durchführung der Echtzeit PCR wurde das StepOnePlus Echtzeit PCR System und das dazugehörige Programm verwendet.

Alle Proben wurden zu Cyclophilin als Haushaltsgen normiert. Die relative Quantifizierung wurde anhand der $\Delta\Delta C_t$ - Methode (Schmittgen and Livak 2008) wie folgt durchgeführt.

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Haushaltsgen}) \quad [\text{für jede Probe kalkuliert}]$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{untersuchte Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

PCR Konditionen sind, wie folgt, in den Tabellen 3.3 und 3.4 genannt. Alle Untersuchungen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 3.3 Konditionen quantitative Echtzeit PCR, CYBR- Green Master Mix		
Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

Tabelle 3.4 Konditionen quantitative Echtzeit PCR, TaqMan Universal Master Mix und Sonde		
Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

Das Prinzip der quantitativen Echtzeit PCR beruht auf der Echtzeitmessung von Fluoreszenzsignalen, welche proportional mit der Menge der PCR- Produkte zunimmt. Dies geschieht dadurch, dass Fluoreszenzfarbstoffe (SYBR- Green) sich nur zwischen doppelsträngiger DNS anlagern. (Schmittgen, Zakrajsek et al. 2000)

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von TaqMan- Sonden, welche an einem Ende einen Quencher, am anderen Ende einen Fluoreszenzfarbstoff besitzen. Taq-Polymerasen, welche neben der Polymeraseaktivität eine 5'-3'Exonuklease- Aktivität besitzen, bauen die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'- Ende ab. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal frei und kann gemessen werden. (Heid, Stevens et al. 1996)

3.4 Detektion fluoreszierender Sonden an Gefrierschnitten

3.4.1 Aufbereitung der Proben

Nach der Probenentnahme wurden die Proben für 30 Minuten bei 37 °C mit der CCKB-Rezeptor- Sonde DQ-MG-754 in PBS, in der Konzentration 5 nM, inkubiert. Nun wurden die Proben für 2 Stunden in einer PFA- Lösung ohne Methanol fixiert (Tabelle 2.6). Danach für 5 Minuten mit PBS gespült. Zum Entwässern wurden die Proben jeweils über Nacht in einer 15 % und 30 % Saccharose- Lösung auf PBS- Basis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Verarbeitung in Kryomedium für Gefrierschnitte eingebettet und bei - 80 °C gelagert.

3.4.2 Detektion der CCKBR- Sonde mittels konfokalem Lasermikroskop

Die Proben wurden am Kryotom bei geringen Lichtverhältnissen in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Zur Aufbewahrung wurden die Schnitte bei - 20 °C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur lichtgeschützt, über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie für eine Minute in 4 % PFA- Lösung ohne Methanol fixiert (Tabelle 2.6). Danach für zwei mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Blocken wurden die Schnitte mit A-Lösung (Tabelle 2.6) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung der Kerne wurden die Schnitte mit DAPI in der Konzentration 1: 1000 in A- Lösung inkubiert. Zur Visualisierung der Membranen wurden die Schnitte mit Phalloidin in der

Konzentration 1: 100 in A- Lösung inkubiert. Phalloidin und DAPI Lösungen wurden zur gleichen Zeit aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte drei mal 20 Minuten mit A- Lösung und 10 Minuten mit PBS gewaschen. Danach mit Eindeckmedium für Gefrierschnitte eingedeckt.

3.4.3 Dokumentation

Zur weiteren Dokumentation wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Imager M2, der Firma Zeiss angesehen und Fotografiert.

3.5 Statistik

3.5.1 Statistische Tests und Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 (La Jolla, USA) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als arithmetisches Mittel, +/- Standardfehler des Mittelwertes, dargestellt. Um die statistische Signifikanz von verschiedenen Gruppen zu untersuchen, wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt. P- Werte sind in den Schaubildern oder den dazugehörigen Legenden dargestellt. Als statistisch signifikant wurden p Werte < 0.05 angesehen. Das Signifikanzniveau ist in den Abbildungen wie folgt angegeben: $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0.001$ (***)

3.5.2 Stichprobengrößen

Für die Auswertung der Histologie wurden N= 114 Polypenproben untersucht. Für die Korrelation von Polypengröße mit dem histologischen Grading wurden folgende Stichprobengrößen verwendet: Gruppe 1-3 mm (N= 20), Gruppe 4-6 mm (N= 15), Gruppe 7-9 mm (N= 4), Gruppe 10-11 mm (N= 10) Gruppe ≥ 20 mm (N= 5).

In die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung zur Cathepsinexpression wurden N= 13 Schnitte für CTSB, N= 18 Schnitte für CTSH und

N= 21 Schnitte für CTSL eingeschlossen. Zur Untersuchung der Cathepsinexpression anhand von quantitativer Echtzeit- PCR wurden N= 10 Adenome und N= 11 Normale Mukosa untersucht.

In die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung, zur Expression des CCKB-Rezeptors, wurden N= 23 Schnitte eingeschlossen.

Für die Detektion der CCKB-Rezeptor- sensitiven Sonde DQ- MG- 754 wurden 4 Polypen von 3 *APC¹³¹¹⁺* - Schweinen untersucht. Zur Kontrolle wurden Proben von normaler Mukosa verwendet. 2 Proben von einem WT- Schwein und eine Probe eines *APC¹³¹¹⁺* - Schweins ging in die Untersuchung ein.

4 Ergebnisse

4.1 Eingehende Analyse der Polypentstehung im *APC*- mutierten Schweinmodell

4.1.1 Phänotypische Variation im *APC*^{1311/+} - Schweinmodell

Zur Untersuchung der phänotypischen Expression des *APC*- Schweinmodells wurden Schweine in regelmäßigen Abständen von 4 bis 6 Monaten koloskopiert (siehe Methoden). Veränderungen bezüglich Polypenanzahl, Polypengröße und Polypenhistologie wurden dokumentiert.

Abbildung 8 zeigt alle Tiere des *APC*- Schweinmodells von 2010 bis 2014. Bis 2014 konnten 3 Generationen an Nachkommen, G0 bis F3, dokumentiert werden. Neben *APC*^{1311/+} - Schweinen wurden auch Tiere mit zusätzlicher *TP53*^{R167H/+} - und *KRAS*^{G12D/+} - Mutation generiert.

Das maximale Alter der Schweine, das bis März 2015 dokumentiert werden konnte, war 2 Jahre und 11 Monate, mit Aussicht auf höhere Lebensalter. Ein großer Vorteil des Tiermodells gegenüber *APC*- Tiermodellen mit Nagetieren wurden hierdurch deutlich: Follow- up- Untersuchungen in großen Zeitabständen von bis zu mehreren Monaten wurden ermöglicht.

Bereits bei der ersten koloskopischen Untersuchung der Tiere mit einem Alter von 3 bis 4 Monaten konnte eine zum Teil sehr ausgeprägte Polyposis im Dickdarm festgestellt werden. Neben Tieren mit ausgeprägter Polyposis konnten jedoch auch Tiere mit einer sehr moderaten und spät beginnenden Polyposis dokumentiert werden. Zur genaueren Untersuchung dieser phänotypischen Variation wurden Schweine des Genotyps *APC*^{1311/+} und *APC*^{1311/+}, *TP53*^{R167H/+}, im Alter zwischen 4 und 7 Monaten bezüglich ihrer Polypenzahlen untersucht. In die Auswertung gingen Tiere mit Altersunterschieden bis zu 3 Monaten in die gleiche Gruppe ein, da es nicht immer möglich war sie in exakt gleichen Abständen zu endoskopieren.

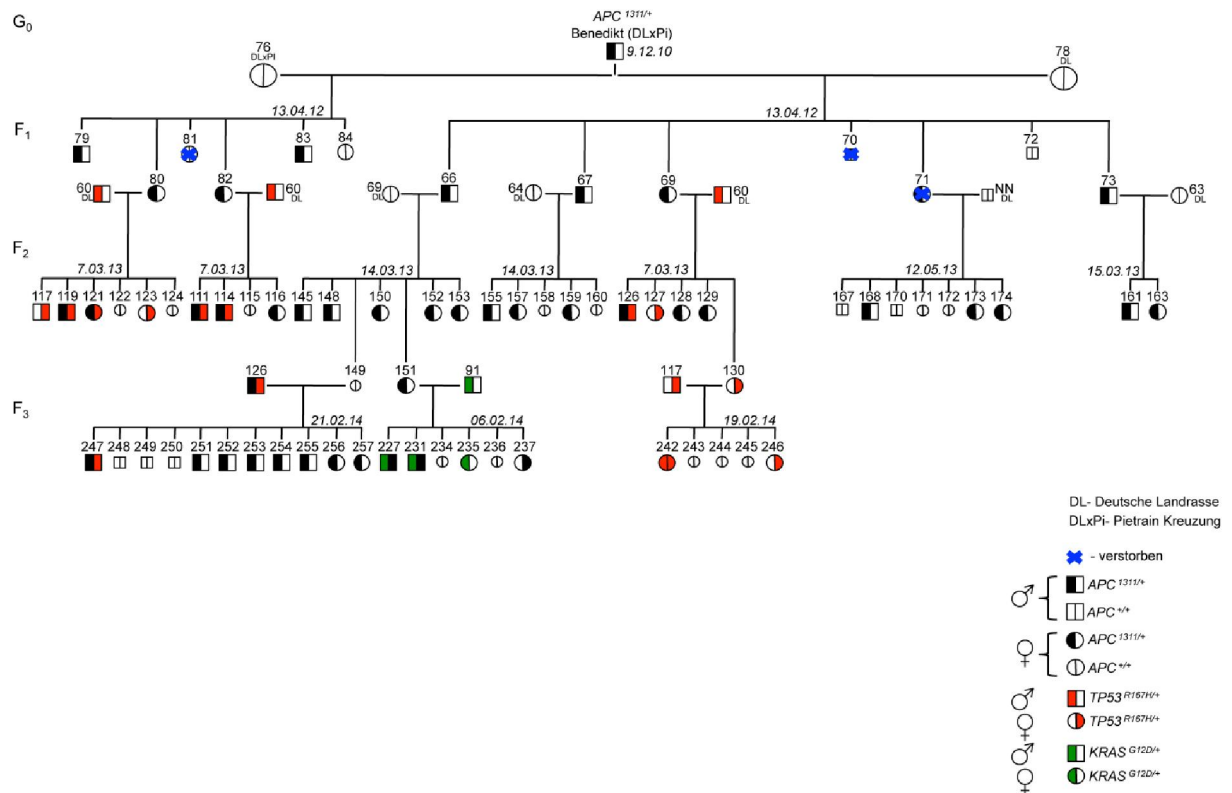


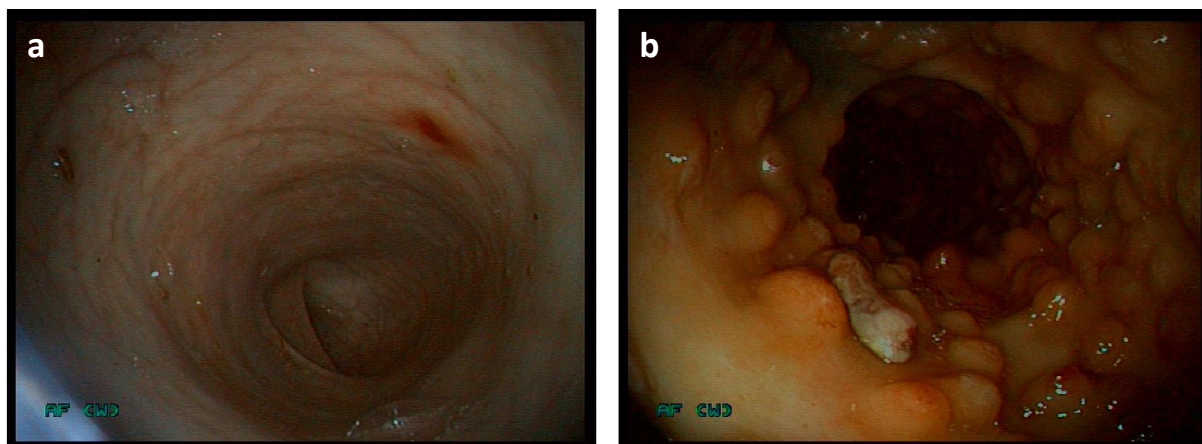
Abbildung 8: Stammbaum des APC- Schweinemodells

Aufgelistet sind alle Schweine der G0 bis F3 Generation. Zucht von 2010 bis 2014. Schweine der Mutation $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$, $KRAS^{G12D/+}$, $APC^{1311/+}$ und $TP53^{R167H/+}$, $APC^{1311/+}$ und $KRAS^{G12D/+}$. Stammbaum Stand Februar 2014

Ergebnisse der Untersuchungen zeigten bei Tieren des selben Genotyps, Genotyp $APC^{1311/+}$ und Genotyp $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$, Variationen in den Polypenzahlen des gesamten Darms von 0 bis 400 Polypen (Abb. 9 B). Nachdem die Anzahl der Polypen dem jeweiligen Darmabschnitt zugeordnet wurden, konnte festgestellt werden, dass vor allem in mittleren Darmabschnitten, bei 30- 60 cm ab anal und im distalen Kolon, bei 30- 0 cm ab anal, die meisten Polypen auftreten.

Insgesamt zeigten die Schweine somit eine unterschiedliche Ausprägung der Polyposis. Zum einen Schweine, die eine "hohe Polypenzahl" und Schweine, die eine "niedrige Polypenzahl" aufwiesen. Schweine, bei denen bei der ersten endoskopischen Untersuchung weniger als 20 Polypen vorhanden waren und mit einem Alter von 12 Monaten weniger als 50 Polypen aufwiesen, wurden zu dem Phänotyp "niedrige Polypenzahl" gezählt.

A



B

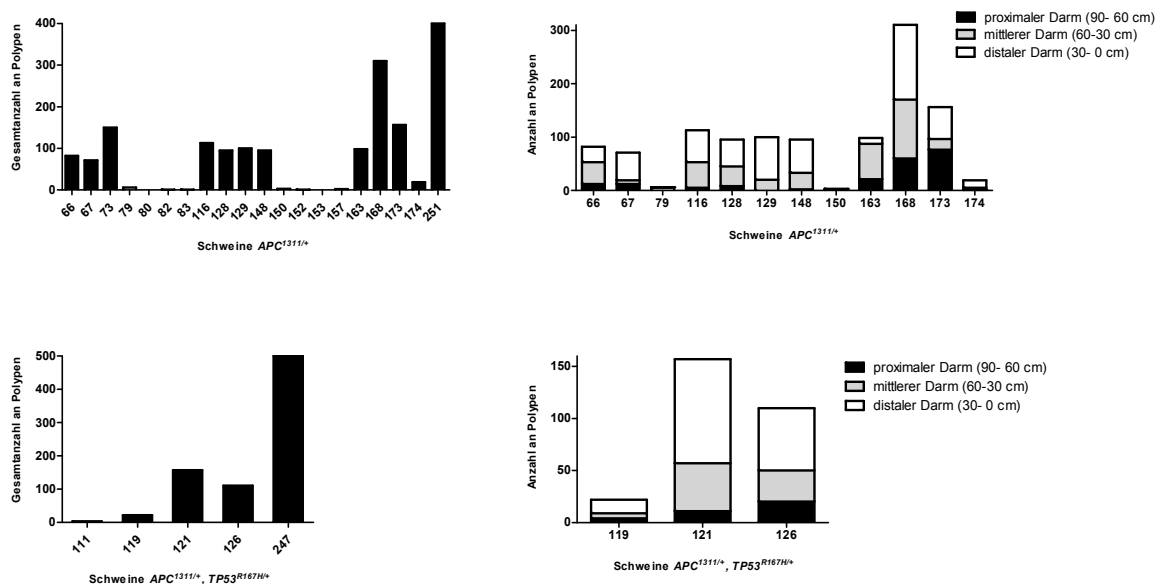


Abbildung 9: Phänotypische Variation im Tiermodell

A) Ausprägung der phänotypischen Variation von Tieren vergleichbaren Alters. Beide Schweine sind Genotyp $APC^{1311/+}$ und zwischen 11 und 14 Monaten alt. Dargestellt sind makroskopische Aufnahmen des Dickdarms, endoskopisch aufgenommen. Bild a zeigt ein Schwein ohne sichtbare polypöse Veränderung des Phänotyps "niedrige Polypenzahl". Bild b zeigt ein Schwein mit einer massiver Polyposis des Dickdarms des Phänotyps "hohe Polypenzahl". Die Bilder wurden zur Verfügung gestellt von Herr Prof. Dr. Saur.

B) Gezeigt sind Schweine zwischen 4 und 7 Monaten des Genotyps $APC^{1311/+}$ und des Genotyps $APC^{1311/+}, TP53^{R167H/+}$. Abgebildet ist die Polypenzahl pro Schwein im gesamten Darm, ebenso die Anzahl an Polypen pro Schwein dem jeweiligen Darmabschnitt zugeordnet. Proximaler Darm entspricht der Länge 90-60 cm ab anal, mittlerer Darm 60-30 cm ab anal und distaler Darm entspricht der Länge 30-0 cm ab anal. Beide Genotypen zeigen variable Anzahlen an Polypen im Darm mit einer höheren Anzahl in mittleren und distalen Darmabschnitten.

Schweine, die bereits bei den ersten Untersuchungen bis zu 100 und mehr Polypen entwickelt haben, wurden zu dem Phänotyp "hohe Polypenzahl" gezählt (Abb. 9 A). Von 27 untersuchten Schweinen des Genotyps $APC^{1311/+}$ wiesen 11 Schweine eine schwache Ausprägung des Phänotyps auf und entwickelten nur wenige Polypen, wohingegen 16 Schweine viele Polypen aufwiesen und eine starke Ausprägung des Phänotyps zeigten. Von 8 untersuchten Schweinen des Genotyps $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$ zeigten nur 2 Schweine eine schwache Ausprägung des Phänotyps, wohingegen 6 Schweine eine starke Ausprägung des Phänotyps aufwiesen.

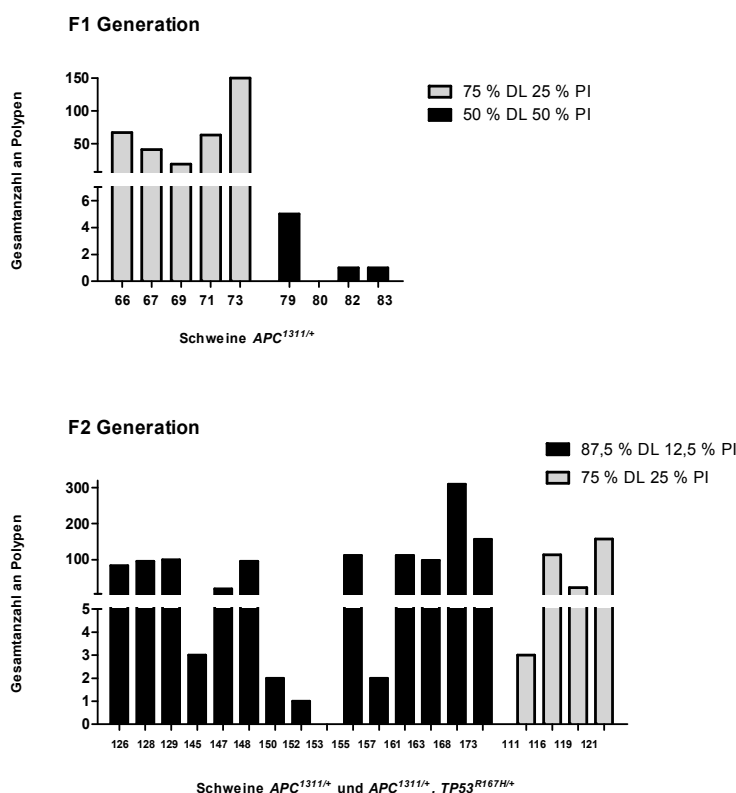


Abbildung 10: Genetischer Hintergrund der Schweine

Die Abbildung zeigt die Korrelation des genetischen Hintergrunds der Schweine Genotyp $APC^{1311/+}$ und $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$ und deren Polypenentwicklung. Oberer Graph: Schweine der F1 Generation, mit dem Genetischen Hintergrund 75 % DL, 25 % PI und 50 % DL, 50 % PI und deren Gesamtanzahl an Polypen bei der ersten Untersuchung nach 3- 7 Monaten. Unterer Graph: Schweine der F2 Generation mit dem Genetischen Hintergrund 75 % DL, 25 % PI und 87,5 % DL, 12,5 % PI und deren Gesamtanzahl an Polypen bei der ersten Untersuchung.

Schweine der Generation F3 entwickelten auffallend hohe Polypenzahlen bereits in einem sehr jungen Alter und wiesen somit eine starke Ausprägung des Phänotyps auf. Bereits nach 3 Monaten traten hier bei Schweinen des Genotyps *APC^{1311/+}* Polypenzahlen von über 400 auf. Schweine des Genotyps *APC^{1311/+}, TP53^{R167H/+}* zeigten sogar über 500 Polypen nach 3 Monaten.

Bereits in der F1 Generation entwickelten Schweine mit dem genetischen Hintergrund 75 % Deutsche Landrasse (DL) , 25 % Pietrain (PI) deutlich mehr Polypen als die Tiere mit dem genetischen Hintergrund 50 % DL, 50 % PI. In der F2 Generation zeigte sich eine ähnliche Ausprägung der Polypenzahlen der Schweine mit 87,5 % DL, 12,5 % PI- Hintergrund im Vergleich mit Schweinen mit dem Hintergrund 75 % DL, 25 % PI. Bei Schweinen mit dem genetischen Hintergrund 87,5 % DL, 12,5 % PI konnten jedoch einige Tiere beschrieben werden, die wiederum sehr wenige bis keine Polypen entwickelten, Ähnliches scheint in Tieren mit dem genetischen Hintergrund 75 % DL, 25 % PI nicht vorzukommen (Abb. 10). Der genetische Hintergrund der F3 Generation konnte nicht eindeutig beschrieben werden, da Tiere auch untereinander verpaart wurden. Die Tendenz lässt jedoch vermuten, dass vor allem Tiere mit dem genetischen Hintergrund 75 % DL, 25 % PI konstant eine hohe Anzahl an Polypen entwickeln.

4.1.2 Histopathologische Analyse des *APC^{1311/+}* - Modells

Sowohl Biopsien von Adenomen als auch von normaler Kolonmukosa zeigten eine dem Menschen ähnliche Histologie. Biopsien der normalen Kolonmukosa zeigten den klassischen intestinalen Schleimhautaufbau. In den Kolonkrypten sah man eine Schicht regelmäßig angeordneter Epithelzellen, welche der Basalmembran aufliegen. Zellkerne waren rund und gleichmäßig, basal der Zelle angeordnet. Die Kern-Plasma-Relation war ca. 1/ 3 Kern, 2/ 3 Plasma, in allen Epithelzellen gleichermaßen. Vereinzelt waren Becherzellen in der Mukosa vorhanden. Die Kolonkrypten

waren länglich der Muskularis Mucosae aufsitzend. Im Stroma konnte man einen lockeren Zellverband sehen.

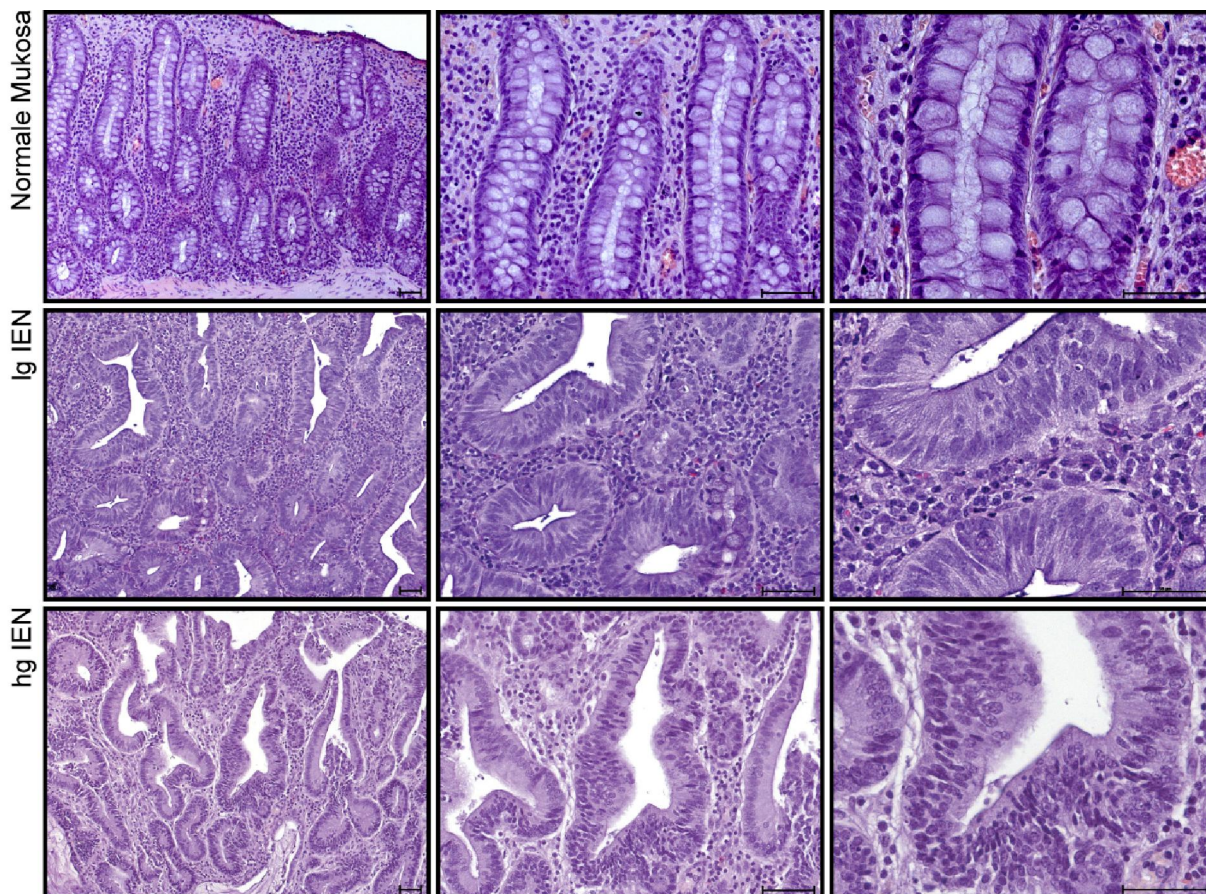
Die meisten entnommenen Polypenproben zeigten die typische Histologie kolorektaler Adenome. Im Adenom wurden die zellulären Atypien, von low grade- Intraepithelialen Neoplasien (lg IEN) zu high grade- Intraepithelialen Neoplasien (hg IEN), hochgradiger. Die Entdifferenzierung des Epithels wurde stärker, Epithelzellen wirkten mehrschichtig, zum Teil nicht mehr der Basalmembran aufliegend. Zellkerne waren vermehrt länglich, ungleichmäßig in der Epithelzelle angeordnet mit großen Nucleoli, die Kern- Plasma- Relation wurde nicht mehr gewahrt.

Wohingegen bei lg IEN zelluläre Veränderungen nur mäßig ausgeprägt auftraten, waren bei hg IEN Atypien verstärkt vorhanden, wodurch das Zellbild vermehrt unstrukturiert wirkt (Abb. 11 A).

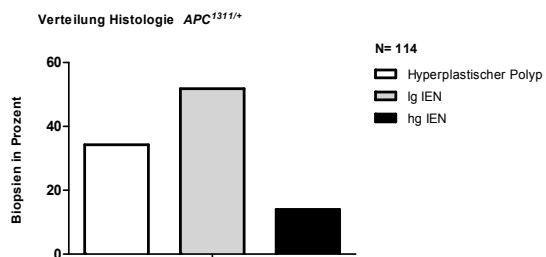
Zur Untersuchung der Histologie wurden 114 Biopsien von Polypen der *APC*^{1311/+}-Schweine entnommen. 39 Polypen (34 %) bestanden aus normaler Mukosa und wurden als Hyperplastische Polypen klassifiziert. 59 Polypen (52 %) zeigten typische Veränderungen, wie sie in humanen Adenomen mit lg IEN vorkommen, 16 Polypen (14 %), wiesen die typischen zellulären Veränderungen der hg IEN auf (Abb. 11 B). Korrelation des histologischen Grading mit der Polypengröße ergab eine positive Korrelation. Je größer der biopsierte Polyp war, desto wahrscheinlicher das Auftreten eines Adenoms des Typs hg IEN. Hierfür wurden 54 Biopsien von Polypen von *APC*^{1311/+} - Schweinen nach ihrer Größe aufgeteilt. Folgende Gruppierungen wurden verwendet: 1-3 mm (N= 20), 4-6 mm (N= 15), 7- 9mm (N= 4), 10- 11mm (N= 10), ≥ 20 mm (N= 5). Auswertungen ergaben 5 % hg IEN - Adenome (N= 1 von 20) in Polypen der Größe 1-3 mm, 7 % hg IEN- Adenome (N= 1 von 15) in Polypen der Größe 4-6 mm, 25 % hg IEN- Adenome (N= 1 von 4) in Polypen der Größe 7-9 mm, 40 % hg IEN- Adenome in Polypen der Größe 10-11 mm (N 4 von 10) und 100 % hg IEN- Adenome in Polypen ≥ 20 mm (N 5 von 5) (Abb. 11 C).

Im Tiermodell konnte ebenso die Entwicklung eines invasiven Karzinoms beobachtet werden. Schwein Nr. 73, Genotyp $APC^{1311/+}$ entwickelte nach 28 Monaten Lebenszeit das erste invasive Karzinom (Abb. 11 D).

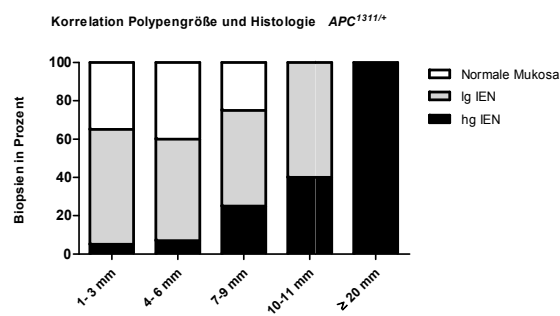
A



B



C



D

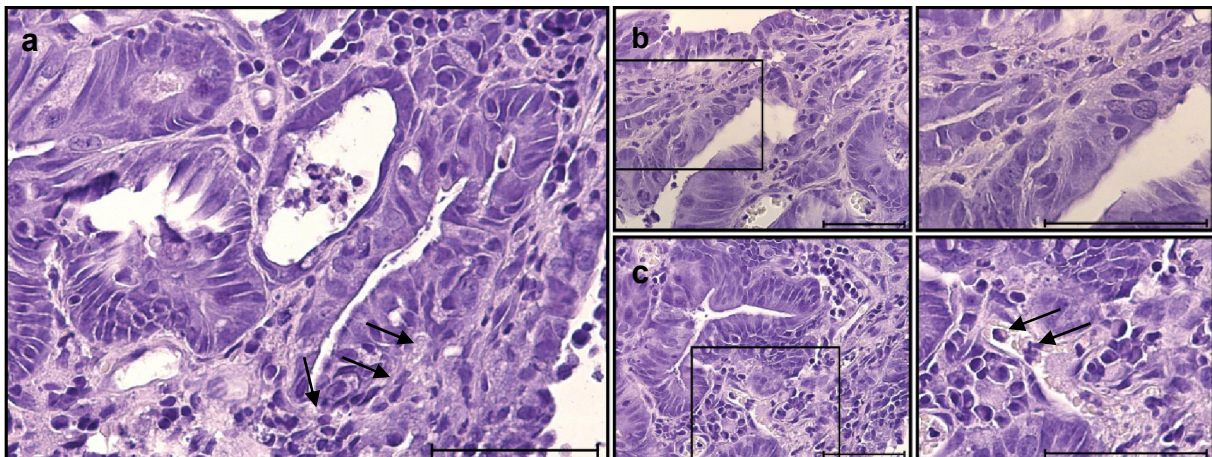


Abbildung 11: Histologische Ergebnisse des $APC^{1311/+}$ - Schweinmodells

A) Histologie der Polypenproben, Normale Mukosa, lg IEN, und hg IEN in je 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Normale Mukosa zeigt eine Schicht regelmäßig angeordneter Epithelzellen, der Basalmembran aufliegend. Zellkerne sind rund, gleichmäßig im basalen Teil der Zelle angeordnet. Lg IEN und hg IEN mit jeweils stärkerer Entdifferenzierung des Epithels. Epithelzellen wirken mehrschichtig, z.T. nicht mehr der Basalmembran aufliegend, Zellkerne sind vermehrt länglich und ungleichmäßig in der Epithelzelle angeordnet. Maßstab entspricht 50 μ m.

B) Histologische Verteilung aller Polypen der $APC^{1311/+}$ Tiere. N= 114. Untersuchungen ergaben 34 % Normale Mukosa, 52 % lg IEN und 14 % hg IEN.

C) Korrelation der Polypengröße mit dem histologischen Grading. Alle Polypen der $APC^{1311/+}$ Tiere wurden in Gruppen bezüglich ihrer Größe aufgeteilt: 1-3 mm (N= 20), 4-6 mm (N= 15), 7- 9 mm (N= 4), 10- 11 mm (N= 10), \geq 20 mm (N= 5). Auswertungen ergaben eine positive Korrelation zwischen Polypengröße und Grading: 5 % hg IEN - Adenome (N= 1 von 20) in Polypen der Größe 1-3 mm, 7 % hg IEN- Adenome (N= 1 von 15) in Polypen der Größe 4-6 mm, 25 % hg IEN- Adenome (N= 1 von 4) in Polypen der Größe 7-9 mm, 40 % hg IEN- Adenome in Polypen der Größe 10-11 mm (N= 4 von 10) und 100 % hg IEN- Adenome in Polypen \geq 20 mm (N= 5 von 5).

D) Histologie des ersten invasiven Karzinoms. Aufgetreten bei Schwein Nr. 73 des Genotyps $APC^{1311/+}$ und des Phänotyps "hohe Polypenzahl", nach 28 Monaten Lebenszeit. a) Übersicht des Karzinoms mit typischem Zellbild. Diffuses Zellbild mit massiver Entdifferenzierung des Epithels, Darmkrypten unregelmäßig, z.T. kaum von Stroma abgrenzbar. Basalmembran an mehreren Stellen durchbrochen, Stroma von Tumorzellen infiltriert (Pfeil). b) Durchbrechen der Basalmembran und Infiltration des Stromas mit Tumorzellen. c) Gefäßinfiltration durch Tumorzellen (Pfeil). Maßstab entspricht 50 μ m.

Abbildung 11 D zeigt die typische Histologie des invasiven Karzinoms. Es stellt sich ein diffuses Zellbild mit massiver Entdifferenzierung des Epithels dar. Darmkrypten sind unregelmäßig angeordnet, zum Teil kaum mehr vom Stroma abgrenzbar. Die Basalmembran ist an mehreren Stellen durchbrochen, das Stroma von Tumorzellen infiltriert. Auch die Gefäßinfiltration durch Tumorzellen konnte beobachtet werden. Dies ermöglicht die hämatogene Metastasierung der Tumorzellen. Metastasen konnten zum Zeitpunkt der Datenerhebung allerdings nicht dokumentiert werden.

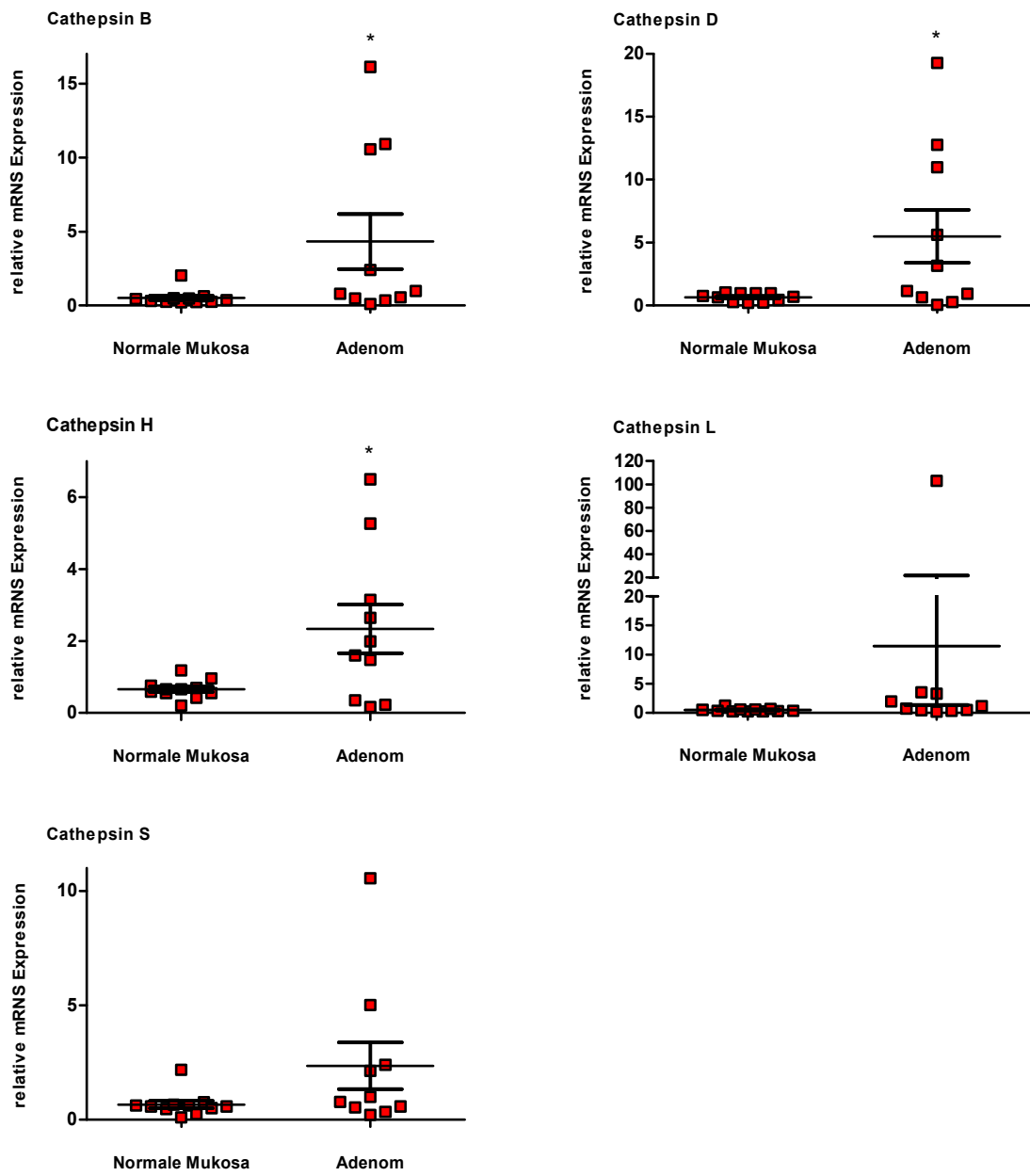
Die Ergebnisse zeigen, dass die Histologie der Schweinepolypen in ihrem Zellaufbau mit dem humaner Adenome vergleichbar ist. Auch konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der biopsierten Polypen typische adenomatöse Veränderungen aufweisen. Schweine des $APC^{1311/+}$ -Modells entwickeln den gesamten lokalen Phänotyp der humanen Erkrankung, ohne bisher Metastasen auszubilden.

4.2 Analyse der Expression von Cathepsinen als Zielstrukturen für Molekulare Bildgebung des Kolonkarzinoms

4.2.1 Expression der Cathepsine B, D, H, L und S in Adenomen von $APC^{1311/+}$ und $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$ - Schweinen

Zur Untersuchung der Expression der Cathepsine B, D, H, L und S in Adenomen von $APC^{1311/+}$ - Schweinen wurde eine quantitative Echtzeit- PCR durchgeführt. In die Untersuchung gingen jeweils Proben von 10 Adenomen und 11 normale Mukosa von $APC^{1311/+}$ - Schweinen ein. Im Vergleich mit normaler Mukosa waren alle Cathepsine in Adenomen überexprimiert (Abb. 12 A). Hierbei ergab sich für Cathepsin B und Cathepsin D eine mittlere Expression, 8,3 mal höher in Adenomen als in normaler Mukosa. Cathepsin H war 3,5 mal höher exprimiert. Cathepsin L und S waren 24,6 (CTSL) und 3,5 (CTSS) mal höher in Adenomen im Vergleich mit normaler Mukosa exprimiert. Nach Anwendung des t-Test für unverbundene Stichproben konnte eine signifikante Überexpression der Cathepsine B, D und H festgestellt werden. P- Werte hierfür waren für Cathepsin B, $p= 0,0452$, für Cathepsin D, $p= 0,0262$ und für Cathepsin H, $p= 0,0180$.

A



B

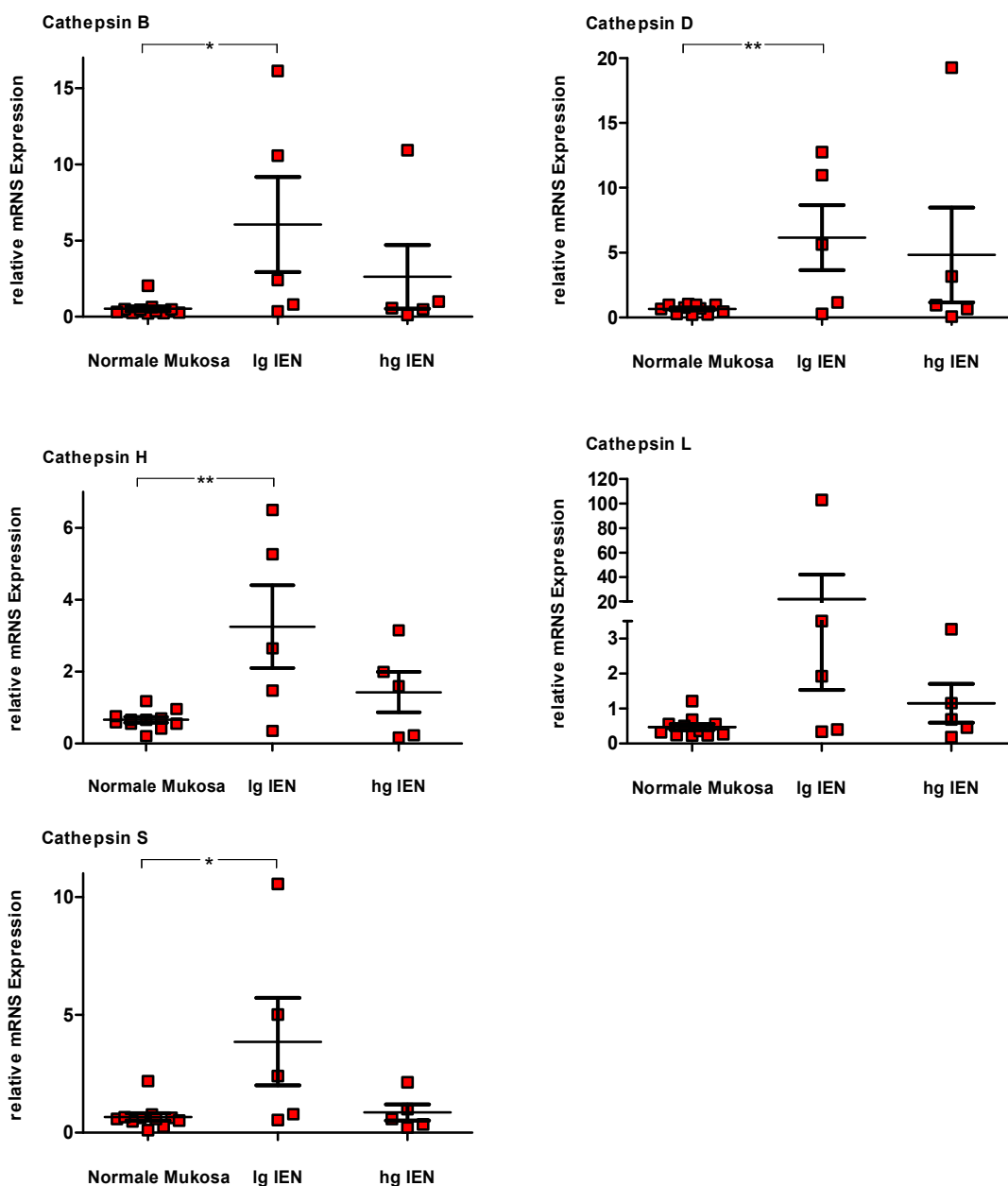


Abbildung 12: Quantitative Expression der Cathepsine

Expression der Cathepsine B, D, H, L, S. Ergebnisse der quantitativen Echtzeit- PCR.

Gezeigt sind die Werte der relativen mRNA Expression je Polyp, ebenso deren Mittelwert, Fehlerbalken zeigen SEM (engl. standard error of the mean).

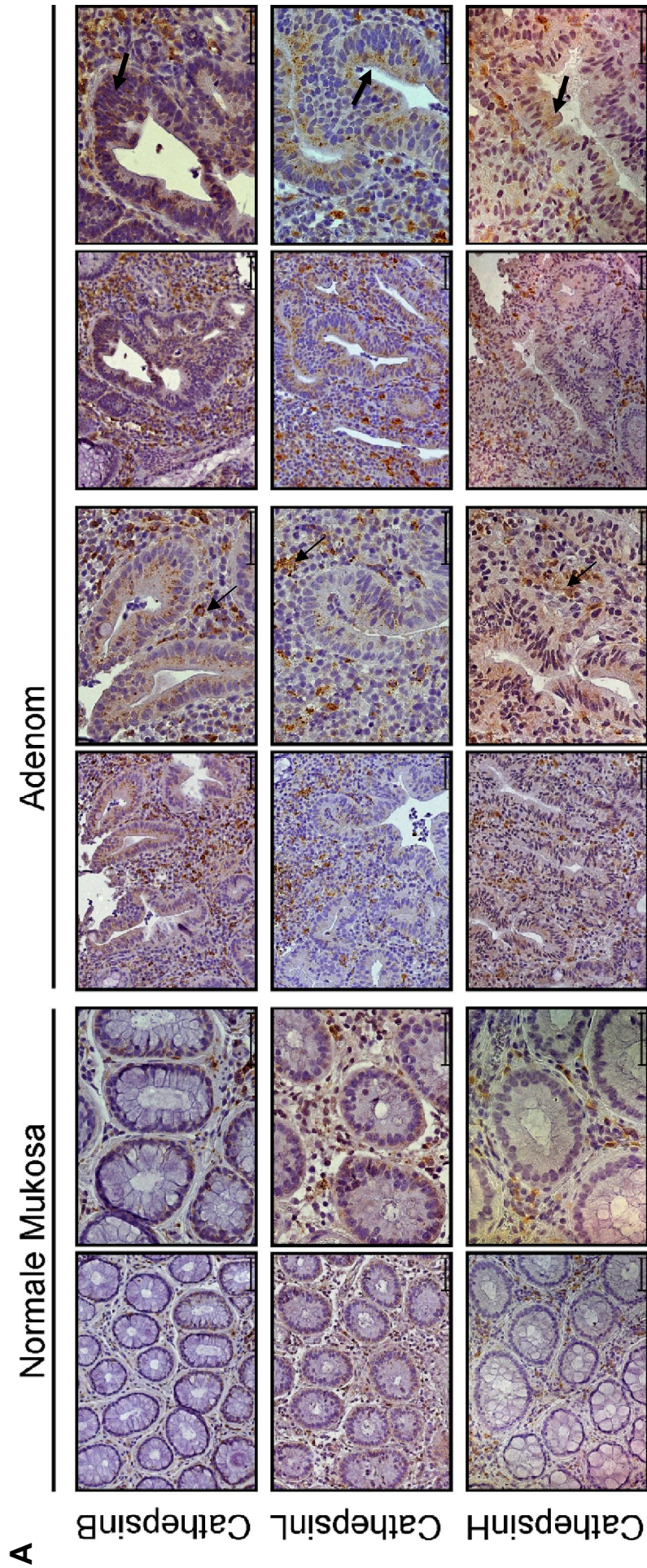
A) Vergleich Adenom und normale Mukosa von $APC^{131/+}$ -Schweinen, Adenom: N= 10, Normale Mukosa: N= 11. Signifikante Überexpression der Cathepsine in den Adenomen: CTSB ($p= 0,0452$), CTSD ($p= 0,0262$), CTSH ($p= 0,0180$), nach Anwendung des t- Test für unverbundene Stichproben.

B) Aufteilung der Adenome in Ig IEN (N= 5) und hg IEN (N= 5). Vergleich Normale Mukosa mit Ig IEN- Adenomen und hg IEN- Adenomen. Vermehrte Expression von Cathepsine in Ig IEN- Adenomen im Vergleich zur normalen Mukosa, signifikant für die Cathepsine B ($p= 0,0164$), D ($p= 0,0045$), H ($p=0,0040$), S ($p= 0,0205$), nach Anwendung des t- Test für unverbundene Stichproben.

Hierbei waren die mittleren Expressionen in lg IEN- Adenomen der Cathepsine B, D, H, L und S um den Faktor 11,7 (CTSB), 9,3 (CTSD), 4,9 (CTSH), 46,7 (CTSL), 5,8 (CTSS), im Vergleich mit normaler Mukosa erhöht. Expressionen in hg IEN-Adenomen waren deutlich geringer, jedoch konnte auch hier eine Überexpression für alle Cathepsine festgestellt werden. Mittlere Expression der Cathepsine in hg IEN-Adenomen im Vergleich mit normaler Mukosa war für die Cathepsine B, D, H, L und S um den Faktor 5,0 (CTSB), 7,3 (CTSD), 2,2 (CTSH), 2,5 (CTSL) und 1,3 (CTSS) erhöht. Nach Anwendung des t-Test für unverbundene Stichproben konnte für alle Cathepsine, außer Cathepsin L, eine signifikante Überexpression in lg IEN-Adenomen im Vergleich mit normaler Mukosa bewiesen werden. P- Werte für Signifikanz waren für Cathepsin B, $p= 0,0164$, für Cathepsin D, $p= 0,0045$, für Cathepsin H, $p= 0,0040$, und für Cathepsin S, $p= 0,0205$.

Zur qualitativen Darstellung der Expression der Cathepsine wurde eine immunhistochemische Färbung für die Cathepsine B, H und L an Adenomen von *APC^{1311/+}* - und *APC^{1311/+}, TP53^{R167H/+}* - Schweinen durchgeführt. Fast alle Präparate zeigten eine positive Färbung von Immunzellen im Stroma (Abb. 13 A). Dies weist auf eine starke tumorassoziierte Inflammation hin. Die Anzeichen einer Entzündung konnten sowohl in Präparaten von normaler Mukosa, als auch in Adenomen gesehen werden. Tumorassoziierte Inflammation war in Adenomen jedoch wesentlich stärker. Präparate von Adenomen zeigten neben tumorassoziierter Inflammation auch Färbung von neoplastisch veränderten Epithelzellen. Durch die lysosomale Lokalisation der Cathepsine, trat eine positive Färbung für Cathepsine zytoplasmatisch und sehr fokal auf, wodurch Epithelzellen gepunktet wirkten.

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate geschah durch Aufteilung nach: positiv für tumorassoziierte Inflammation (i), positiv für tumorassoziierte Inflammation und Tumorzellen (i), (t) und keine Färbung der Präparate (n).



B

Immunhistochemie Cathepsine			
	CTSB (%)	CTSH (%)	CTSL (%)
N	13	18	21
Positiv (i)	7 (54)	6 (33)	5 (24)
Positiv (i),(t)	5 (38)	10 (56)	12 (57)
Negativ (n)	1 (8)	2 (11)	4 (19)

Abbildung 13: Qualitative Expression der Cathepsine

A) Immunhistochemische Ergebnisse, Expression der Cathepsinen B, H und L. In Adenomen ist eine deutliche Anfärbung der Tumorzellen im Kolonepithel zu erkennen. Die Anfärbung ist vor allem zytoplasmatisch, fokal verstärkt zu sehen (dicker Pfeil). Ebenso sind Immunzellen im Stroma verstärkt sichtbar (dünner Pfeil). Im Vergleich hierzu ist in der normalen Mukosa keine Anfärbung des Epithels zu erkennen, jedoch lassen sich auch hier Immunzellen im Stroma anfärben. Maßstab entspricht 50 µm.

B) Tabelle zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Präparate. CTSB (N= 13): 7 Präparate zeigen nur eine positive Anfärbung der Immunzellen im Stroma (i) (54 %), 5 Präparate zeigen positive Anfärbung in Tumorzellen (t) und Immunzellen (i) (38 %), keine Anfärbung (n) 1 Präparat (8 %). CTSH (N= 18), positiv Immunzellen (i) 6 (33 %), positiv Immunzellen und Tumorzellen (i),(t) 10 (56 %), negativ 2 (11 %). CTSL (N= 21), positiv Immunzellen (i) 5 (24 %), positiv Immunzellen und Tumorzellen (i),(t) 12 (57 %), negativ 4 (19 %).

Von 13 Präparaten, die auf die Expression von Cathepsin B untersucht wurden, zeigten 7 Präparate eine positive Färbung für tumorassoziierte Inflammation (54 %), 5 Präparate zeigten eine positive Färbung in Immunzellen und Tumorzellen (i), (t) (38 %), kein Nachweis von Cathepsin B konnte in 1 Präparat (8 %) festgestellt werden. Für 18 Präparate, die auf die Expression von Cathepsin H untersucht wurden, zeigten 6 Präparate positive Ergebnisse für tumorassoziierte Inflammation (i) (33 %), 10 Präparate waren positiv in Immunzellen und Tumorzellen (i), (t) (56 %) und 2 Präparate waren negativ für die Expression von Cathepsin H (n) (11 %). Die Ergebnisse für 21 Präparate, die auf die Expression von Cathepsin L untersucht wurden, ergaben 5 positive Präparate für die Expression in Immunzellen (i) (24 %), 12 Präparate zeigten eine positive Expression in Immunzellen und Tumorzellen (i),

(t) (57 %) und 4 Präparate wiesen keine Cathepsin L- Expression auf (n) (19 %) (Abb. 13 B).

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass sich Cathepsine als Zielstruktur zur Molekularen Bildgebung eignen. Fast alle Cathepsine waren in quantitativen Analysen signifikant überexprimiert. Auch die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten eine spezifische Färbung von Tumorzellen in der Mehrzahl der Präparate.

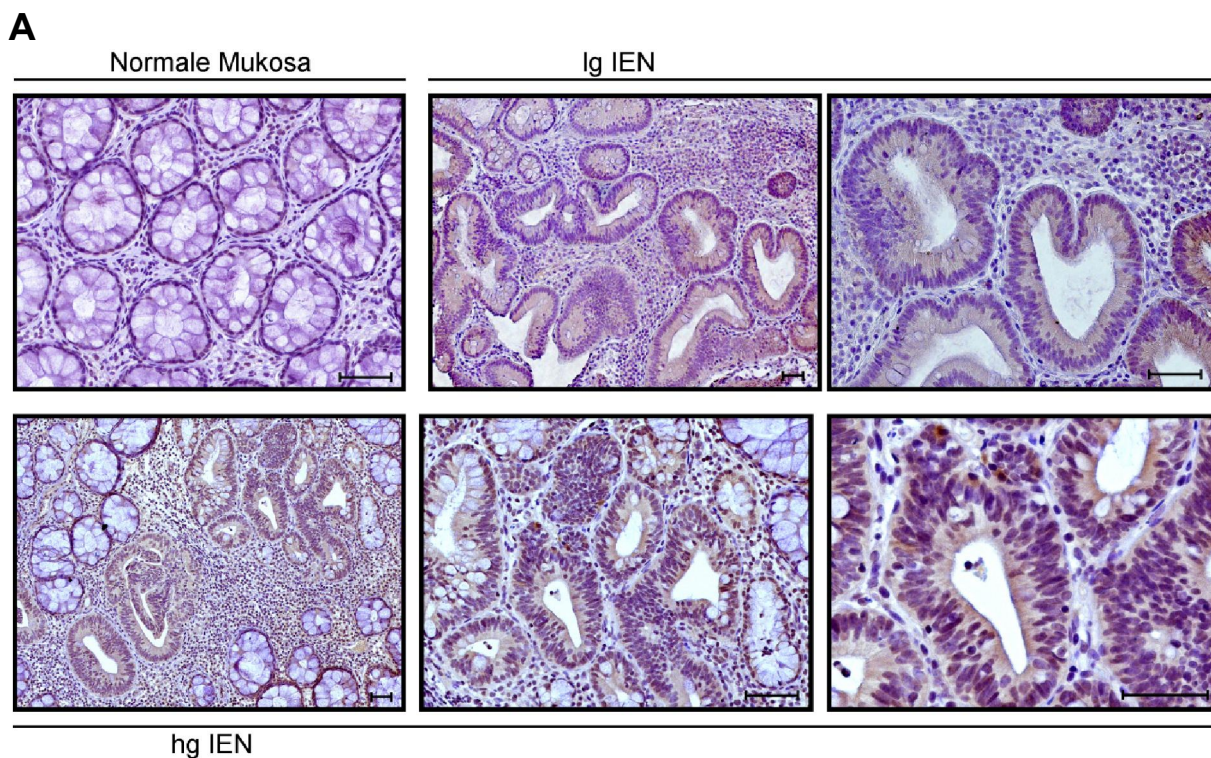
4.3 Analyse der Expression des CCKB- Rezeptors als Zielstruktur für Molekulare Bildgebung des Kolonkarzinoms

4.3.1 Expression des CCKB- Rezeptors in Adenomen von $APC^{1311/+}$ und $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$ - Schweinen

Zur Untersuchung der qualitativen Expression des CCKB- Rezeptors wurde eine immunhistochemische Färbung an 23 Präparaten von $APC^{1311/+}$ und $APC^{1311/+}$, $TP53^{R167H/+}$ - Schweinen durchgeführt. Hier konnte eine positive Färbung für den CCKB- Rezeptor in Adenomen der Schweine gezeigt werden. 21 Präparate (91 %) zeigten eine positive Färbung des Epithels für den CCKB- Rezeptor. Keine Färbung und somit kein Nachweis des CCKB-Rezeptors wurde in 2 Fällen (9 %) der Präparate gesehen (Abb. 14 B). Präparate der normalen Mukosa wiesen keine Expression des CCKB-Rezeptors auf, wohingegen lg IEN- Adenome eine leichte, jedoch spezifische Färbung im Epithel zeigten. Auch hg IEN- Adenome wiesen eine spezifische CCKB- Rezeptor - Färbung im Epithel auf.

Es konnte keine Steigerung der Rezeptorexpression zwischen lg IEN- Adenomen zu hg IEN- Adenomen gesehen werden.

Die immunhistochemische Ergebnisse zeigen, dass der CCKB- Rezeptor eine geeignete Zielstruktur für Molekulare Bildgebung des Kolonkarzinoms sein kann, da er in fast allen Adenomen im Gegensatz zur normalen Mukosa exprimiert ist.

**B**

<i>Immunhistochemie des CCKB-Rezeptors</i>	
	CCKBR (%)
N	23
Positiv	21 (91)
Negativ	2 (9)

Abbildung 14: Überexpression des CCKB- Rezeptors in Adenomen des Kolons

A) Immunhistochemische Ergebnisse der Expression des CCKB- Rezeptors. Sichtbare Anfärbung der Tumorzellen des Kolonepithels in lg IEN- und hg IEN- Adenomen. Anfärbung zytoplasmatisch, verstärkt basal und perinukleär. Keine Steigerung der Färbung von lg IEN zu hg IEN erkennbar. Keine Anfärbung der normalen Mukosa. Maßstab entspricht 50 µm.

B) Tabelle zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Präparate. N= 23. Positive Anfärbung der Tumorzellen und Nachweis des CCKB- Rezeptors in 21 Fällen (91 %), keine Anfärbung in 2 Fällen (9 %).

Zur spezifischen Darstellung des CCKB- Rezeptors mittels der fluoreszierenden Sonde DQ-MG 754 wurden sowohl normale Mukosa von WT- Tieren, als auch normale Mukosa und Adenome von *APC^{1311/+}*- Schweinen mit der NIRF- Sonde (engl. Near- Infrared- Fluorescence) inkubiert, Gefrierschnitte angefertigt und das fluoreszierende Signal mittels einem konfokalen Lasermikroskop detektiert.

Zur Darstellung der zellulären Strukturen wurde mit Phalloidin gefärbt (Abb. 15 A). In Schnitten der normalen Mukosa konnte kein fluoreszierendes Signal und somit Detektion der NIRF-Sonde beobachtet werden. In Adenomen war das Signal der Sonde im allgemeinen sehr schwach, jedoch in allen Schnitten vorhanden. An einigen Stellen konnte ein besonders deutliches Signal im Stroma aufgenommen werden, was möglicherweise eine stromale Infiltration durch Tumorzellen darstellt.

Zur in vivo- Diagnostik der CCKBR- Sonde DQ-MG 754 wurde die Sonde lokal auf makroskopisch polypös veränderten Arealen des Dickdarms der Schweine aufgetragen. Die Tiere wurden endoskopiert. Nach hinzuschalten des Schwarzlichts konnte ein deutliches Signal, analog der makroskopisch sichtbaren Veränderungen detektiert werden (Abb. 15 B).

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass es prinzipiell möglich sein sollte die Adenome des Kolons anhand der CCKB-Rezeptor spezifischen Sonde DQ-MG 754 zu detektieren. In Gefrierschnitten ist das Signal tendenziell sehr schwach, jedoch vor allem in Bereichen von stromaler Infiltration durch Tumorzellen detektierbar. Die in vivo- Bildgebung konnte zeigen, dass Areale analog der makroskopisch sichtbaren Veränderungen dargestellt werden.

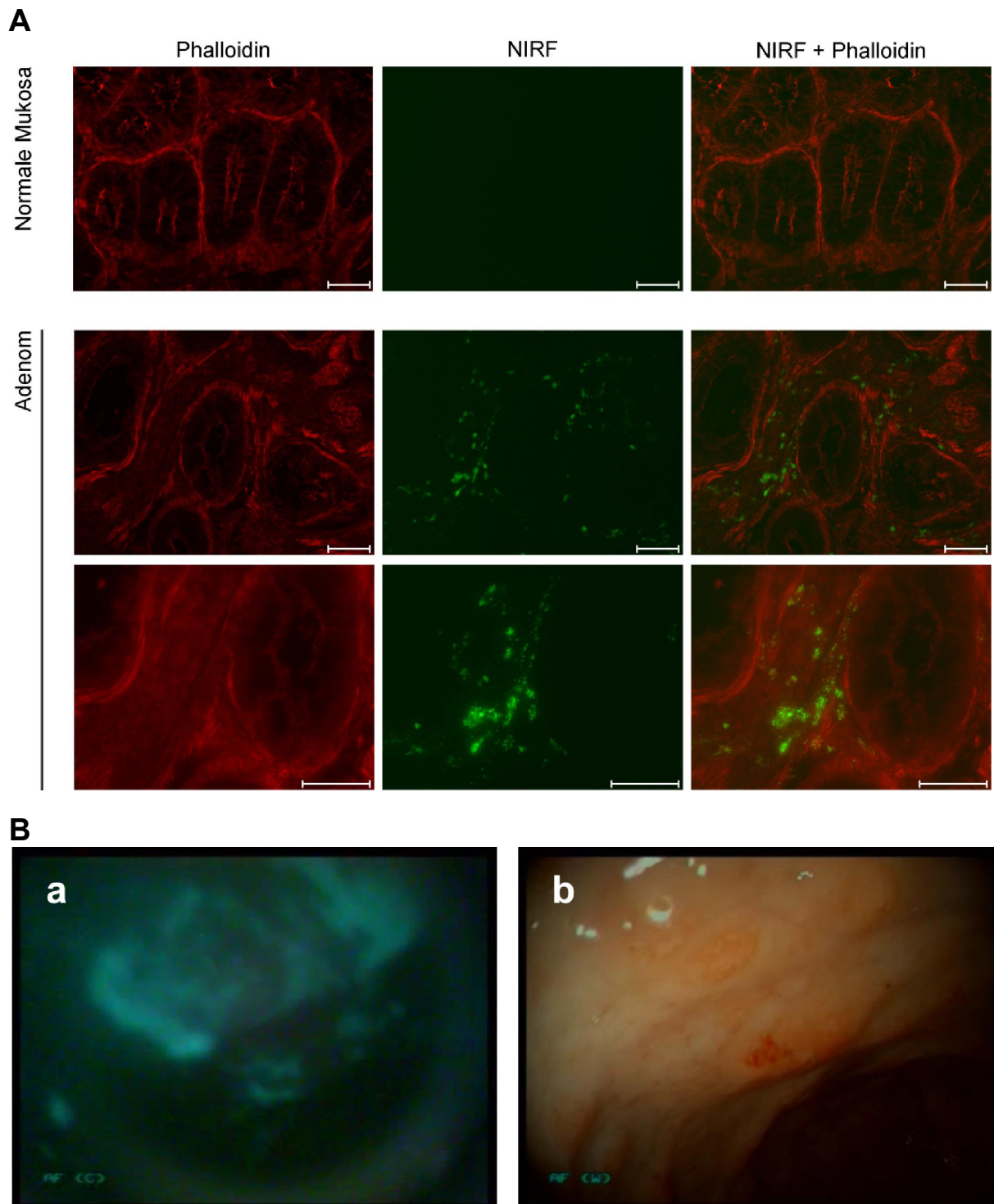


Abbildung 15: In vitro- und in vivo- Darstellung der CCKBR- Sonde DQ- MG- 754

A) Konfokale Lasermikroskopie, Vergleich Normale Mukosa und Adenom ,*APC*^{1311/+}, in 200- und 400-facher Vergrößerung. Phalloidin: Darstellung der zellulären Struktur (rot), NIRF: aktivierte CCKBR-Sonde, DQ- MG- 754 (grün). Keine Aktivierung der CCKB- Sonde in normaler Mukosa. Detektion des Signals in Adenomen. Maßstab entspricht 50 µm.

D) In vivo Detektion der DQ-MG 754- Sonde nach lokaler Applikation im Dickdarm beim Schwein. Bildgebung durch Endoskop. Bild a zeigt das deutliche Signal der DQ-MG 754- Sonde im Schwarzlicht. Bild b zeigt die dazugehörige makroskopische Veränderung der Darmschleimhaut.

5 Diskussion

Darmkrebs ist eine häufige Todesursache in der Westlichen Welt. (Malvezzi, Bertuccio et al. 2014). Neben hohen Mortalitätsraten kommen, verursacht durch die hohe Inzidenz, enorme Kosten auf eine Gesellschaft zu. Hierbei spielen sowohl direkte, medizinische Kosten, in Form von Behandlungskosten (Seal, Sullivan et al. 2013), als auch indirekte Kosten durch Lohnausfälle eine Rolle (Hopkins, Goeree et al. 2010). Medizinische Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung von adenomatösen Präkanzerosen im Kolon senken nachweislich Inzidenz und Mortalität (Schoen, Pinsky et al. 2012, Nishihara, Wu et al. 2013) und bleiben bis in hohe Lebensalter kosteneffektiv (van Hees, Habbema et al. 2014). Die sensitivste Methode zur Detektion von Adenomen im Dickdarm stellt heutzutage die Koloskopie dar (Quintero, Castells et al. 2012). Sie ist jedoch stark abhängig vom durchführenden Untersucher, kleine Läsionen können leicht übersehen werden und sich in den darauffolgenden Jahren zu einem invasiven Karzinom entwickeln (Kaminski, Regula et al. 2010).

Durch die Anwendung von molekularer Bildgebung eröffnet sich die Möglichkeit kleine Adenome zuverlässiger zu detektieren, wodurch eine weitere Senkung der Mortalität erreicht werden könnte.

Als Zielstrukturen eignen sich Proteine, die im Kolon- Adenom im Vergleich mit der normalen Mukosa überexprimiert werden. Mögliche Zielstrukturen zur molekularen Bildgebung des Kolonkarzinoms sind sowohl Cathepsine als auch der CCKB-Rezeptor, deren Expression in kolorektalen Adenomen bereits beschrieben werden konnte (Smith and Watson 2000, Gounaris, Tung et al. 2008, Zhang, Morgan et al. 2008). Cathepsine sind lysosomale, proteolytische Enzyme, die vor allem an der Tumorprogression und Invasion beteiligt und in verschiedenen Karzinomen zu finden sind (Talieri, Papadopoulou et al. 2004). Beim CCKB- Rezeptor hingegen handelt es sich um einen 7- Transmembranrezeptor, dessen missgespleißte Variante

zu einem gesteigerten Zellwachstum führt, was die Entstehung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen begünstigt (Hellmich, Rui et al. 2000, Kossatz, Behe et al. 2013). Mit Hilfe von spezifischen, fluoreszierenden Sonden ist es nun möglich, adenomatöse Veränderungen zu detektieren und frühzeitig zu erkennen. Cathepsine können durch die Cathepsin-aktivierbare Sonde ProSense detektiert werden, wie sie Eser et al. schon zur Darstellung von PanINs verwendeten (Eser, Messer et al. 2011). Eine CCKBR - aktivierbare Sonde, DQ- MG- 754 wurde von Kossatz et al. 2013 entwickelt und auch in dieser Arbeit verwendet (Kossatz, Behe et al. 2013).

In dieser Arbeit wurde die Expression einer umfassenden Gruppe von Cathepsinen, den Cathepsinen B, H, L, S und D, in Adenomen von $APC^{1311/+}$ - Schweinen untersucht. Ebenfalls wurden Adenome auf die Expression des CCKB- Rezeptors untersucht und diese anschließend mit der DQ- MG- 754- Sonde detektiert. Ziel war die umfassende Untersuchung von kolorektalen Adenomen auf die Anwendbarkeit von molekularer Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms.

In Untersuchungen der Immunhistochemie zeigte sich eine spezifische Expression des CCKB-Rezeptors in Adenomen von $APC^{1311/+}$ - Schweinen, wohingegen die Mukosa negativ war. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Vielzahl an Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die unterschiedliche Modelle und Techniken verwendet haben (Smith and Watson 2000). Schmitz et al. konnten in humanen kolorektalen Karzinomen eine Expression des CCKB-Rezeptors von 38 % im Vergleich zu nur 13 % in normaler Mukosa feststellen. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Stärke der CCKBR- Expression und dem histologischen Grading festgestellt werden (Schmitz, Otte et al. 2001). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Beobachtungen überein, auch wir konnten keine Korrelation zwischen der CCKBR- Expression und dem histologischen Grading beobachten. Weitere Arbeitsgruppen konnten ebenso positive Ergebnisse der CCKBR- Expression in kolorektalen Karzinomen erzielen. Bei Chao et al. waren 39 % der kolorektalen

Karzinome für CCKBR positiv (Chao, Tallman et al. 2005), bei Yu et al. waren es 44 % (Yu, Tong et al. 2006) und bei Körner et al. sogar 69 % (Körner, Waser et al. 2010), (Roy, Putt et al. 2016). Der CCKB-Rezeptor ist marginal an der Proliferation der Kolonmukosa und somit der Tumorentstehung beteiligt. Jin et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass in CCKBR-defizienten Mäusen trotz eines Überangebotes des Liganden Gastrin, die Proliferation des Kolonepithels ausblieb und CCKBR-defiziente Mäuse eine verminderte Anzahl an Adenomen entwickelten (Jin, Ramanathan et al. 2009). Durch die Überexpression des CCKB-Rezeptors in kolorektalen Adenomen und Karzinomen wie wir in dieser Arbeit nachweisen konnten und es auch in der Literatur häufig beschrieben ist, eignet er sich als Zielstruktur für molekulare Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms. Zur Bildgebung von Adenomen ist es möglich das MG-754 Minigastrinpeptid zu verwenden, das an den CCKB-Rezeptor bindet. Es wurde von Kossatz et al. an eine fluoreszierende Sonde gekoppelt, wodurch die Bindung des Peptids an den Rezeptor nachgewiesen werden kann (Kossatz, Behe et al. 2013).

In dieser Arbeit wurden Adenome von *APC^{1311/+}* - Schweinen mit der CCKBR-spezifischen Sonde inkubiert und die Detektion der Sonde *in vivo* und *in vitro* beschrieben. Es konnte eine Akkumulation des fluoreszierenden Signals in Adenomen *in vivo* sowie *in vitro*, im Vergleich mit der normalen Mukosa, beobachtet werden.

In vivo wurde die Sonde während der endoskopischen Untersuchung auf den Adenomen des Schweins appliziert. Nach kurzer Inkubation konnte durch Hinzuschalten des Fluoreszenzlichtes ein deutliches Signal der Sonde detektiert werden, welches mit der makroskopischen Lokalisation der Adenome übereinstimmte.

Zur Untersuchung der spezifischen Sondenbindung *in vitro* wurden Adenome und normale Mukosa von *APC^{1311/+}*- und Wildtyp- Schweinen mit der CCKBR-spezifischen Sonde inkubiert und anschließend Kryoschnitte gefertigt.

Zur weiteren Verifikation der Bindung der CCKBR-spezifischen Sonde wurde die Detektion der Sonde mikroskopisch dargestellt. Im konfokalen Lasermikroskop zeigte sich das fluoreszierende Signal der Sonde sehr schwach, jedoch in den Adenomen im Vergleich mit der normalen Mukosa vorhanden. Ein besonders deutliches Signal konnte in Bereichen des Stromas detektiert werden. Dies könnte ein Hinweis auf Stromainfiltration von Tumorzellen sein. Im Hinblick auf das generell sehr schwache Signal könnten eben solche Bereiche, in denen Tumorzellen akkumulieren, besser detektiert worden sein.

Die deutlich reduzierte Signalstärke der Sonde *in vitro* im Vergleich mit der Signalgebung *in vivo*, könnte mit dem Verlust der Signalintensität der sehr lichtsensiblen Sonde, durch mehrere Arbeitsschritte von Inkubation der Adenome bis hin zum Fertigen der Kryoschnitte, erklärt werden.

Es konnte jedoch insgesamt gezeigt werden, dass die Detektion von kolorektalen Adenomen durch eine CCKBR-spezifische Sonde möglich ist.

Die Untersuchungen zur Cathepsin- Expression in Adenomen des Schweins, verglichen mit normaler Mukosa, zeigten die selben Ergebnisse wie bereits in unterschiedlichen Publikationen beschrieben. Die quantitative Expression der Cathepsine war für alle Cathepsine in Adenomen höher als in der normalen Mukosa. Für Cathepsin L ergab sich die höchste Differenz. In Adenomen war die Expression von Cathepsin L 24,6 mal höher als in der normalen Mukosa. Für die Cathepsine B, D, H und S ergaben sich mittlere Expressionen 8,3 (CTSB und CTSD) 3,5 (CTSS und CTSH) mal höher in Adenomen als in der normalen Mukosa. Eine signifikante Überexpression ergab sich für die Cathepsine B, D und H. Im Vergleich von hg IEN- und lg IEN- Adenomen mit normaler Mukosa konnte gezeigt werden dass die

Expression aller Cathepsine in lg IEN- Adenomen höher als in hg IEN- Adenomen war.

Auch in der Immunhistochemie zeigten sich in der Mehrzahl der Adenome positive Ergebnisse für die Expression der untersuchten Cathepsine B, D und L. Auffällig war hier eine sehr starke, tumorassoziierte Inflammation, welches sich durch viele Immunzellen im Stroma bemerkbar machte. Die Zeichen einer Entzündung waren in den Adenomen wesentlich stärker vorhanden als in den Biopsien der normalen Mukosa. Das Auftreten einer tumorassoziierten Inflammation ist bei kolorektalen Karzinomen und Adenomen nicht selten, da die neoplastischen Veränderungen des Epithels eine lokale Immunantwort auslösen (Camus, Tosolini et al. 2009).

Als Ursachen für die erhöhte Expression der Cathepsine in lg IEN- Adenomen im Vergleich mit hg IEN- Adenomen, können verschiedene Ursachen diskutiert werden. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte eine Korrelation zwischen einer verstärkten tumorassoziierten Inflammation und der stärkeren Expression der Cathepsine in lg IEN- Adenomen, im Vergleich mit der Cathepsin- Expression in hg IEN- Adenomen, sein. Beispielsweise konnten McLean et al. 2011 herausfinden, dass die Expression von inflammatorischen Genen, die auch zur Induktion des Tumors beitragen, in der Transformation von normaler Mukosa zum Adenom stärker exprimiert sind als in der Transformation vom Adenom zum invasiven Karzinom (McLean, Murray et al. 2011). Die Ergebnisse dieser Studie sind ein Hinweis darauf, dass dies auch für die Cathepsine zutreffen könnte.

Eine weitere Erklärung für die stärkere Expression der Cathepsine in lg IEN- Adenomen als in hg IEN- Adenomen könnte eine Form von negativer Rückkopplung in der Regulation der Cathepsinexpression sein, wie es auch bei der Expression anderer Proteine vorkommt (Weiss and Kavanau 1957, Kress, Cannell et al. 2011). Sind ausreichend Cathepsine auf Proteinebene in Form einer starken inflammatorischen Reaktion auf die Tumorprogression vorhanden, wird eventuell

die Expression der mRNA und somit die Produktion weiterer Proteine herabreguliert. Vor allem die Tatsache, dass in der Immunhistochemie keine wesentlichen Unterschiede in der Stärke der Inflammation zwischen Ig IEN und hg IEN gesehen werden konnte, würde für diese Hypothese sprechen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse der Cathepsin- Expression von Adenomen gezeigt haben, dass Cathepsine sowohl auf mRNA- als auch auf Protein- Ebene überexprimiert sind. Vor allem durch die besonders hohe Expression der Cathepsine in frühen Formen der Adenome eignen sie sich gut als Zielstruktur zur molekularen Bildgebung, zur Früherkennung von Vorstufen des Kolonkarzinoms.

Im Tiermodell der *APC^{1311/+}*- Schweine, konnten einige Vorteile für die Forschung am kolorektalen Karzinom gesehen werden. Sowohl der Phänotyp "niedrige Polypenzahl" als auch der Phänotyp "hohe Polypenzahl" entwickelten Polypen im Kolon und Rektum, beim Phänotyp mit hohen Polypenzahlen konnten bis zu 400 Polypen dokumentiert werden. Wie bereits von Kossatz et al. beschrieben, stellt dies ein deutlicher Vorteil gegenüber *APC*-Tiermodellen mit Nagetieren dar (Kossatz, Behe et al. 2013). Mäuse entwickeln vor allem im Dünndarm eine Polyposis, mit weit aus geringeren Polypenzahlen als es bei Schweinen beobachtet werden konnte (Boivin, Washington et al. 2003). Die ausgeprägte Polyposis im Dickdarm der Schweine war mit einem Schwerpunkt auf den distalen Kolon und das Rektum lokalisiert. Dies entspricht auch der häufigsten Lokalisation von sporadischen, kolorektalen Karzinomen und Adenomen beim Menschen (Shinya and Wolff 1979).

Trotz der durchschnittlich guten Polypenentwicklung der Tiere, gab es innerhalb des Tiermodells doch deutliche Unterschiede. So entwickelten vor allem Tiere mit dem genetischen Hintergrund 50 % DL, 50 % PI kaum Polypen. Tiere mit dem genetischen Hintergrund 87,5 % DL, 12,5 % PI und 75 % DL, 25 % PI waren in der Polypenentwicklung deutlich homogener, jedoch konnten in den Tieren mit dem

genetischen Hintergrund 87,5 % DL, 12,5 % PI einige Tiere beschrieben werden, die kaum bis keine Polypen entwickelten. In Tieren der F3- Generation traten nun auffallend viele Polypen bereits nach 3- 4 Monaten Lebenszeit auf. Bis zu 500 Polypen konnten beschrieben werden. Der genetische Hintergrund dieser Tiere konnte auf Grund von Verpaarung untereinander nicht eindeutig bestimmt werden. Die Beobachtungen aus den F1 und F2- Generationen weisen jedoch darauf hin, dass vor allem Tiere mit einem Pietrain- Anteil von ungefähr 25 % ausgesprochen viele Polypen entwickeln, was eine Erklärung für die starke Ausprägung des Phänotyps der F3- Generation sein kann.

Variationen im Phänotyp eines Genotyps wurden bereits bei Mäusen und Menschen festgestellt und sind typisch für eine *APC*- Keimbahnmutation (Martin-Denavit, Duthel et al. 2001, Crabtree, Tomlinson et al. 2002, Zeineldin and Neufeld 2013). Gründe für die Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen sind sogenannte "modifier genes" (engl. modifizierende Gene). Dies sind Gene die protumorige oder antitumorige Eigenschaften aufweisen und in verschiedenen Individuen unterschiedlich stark exprimiert werden, so dass es zu einer unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps kommt (Martin-Denavit, Duthel et al. 2001, Zeineldin and Neufeld 2013).

Die Mehrzahl der biopsierten Polypen wiesen die typische Histologie von Adenomen auf. 52 % aller biopsierten Polypen waren lg IEN- und 14 % hg IEN- Adenome. Wie Flisikowska et al. bereits feststellten, entsprachen die kolorektalen Adenome des Schweins histologisch den humanen Adenomen des Dickdarms (Flisikowska, Merkl et al. 2012). Es konnte ebenfalls das erste invasive Karzinom des *APC^{1311/+}*- Schweinemodells in einem Alter von 28 Monaten dokumentiert werden. Dieser Fund zeigt eine Weiterentwicklung der Ausprägung des Phänotypes von einer adenomatösen Polyposis hin zu einem invasiven Karzinom.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das *APC*- mutierte Schweinmodell Vor- als auch Nachteile gegenüber Nagetierenmodellen aufweist. Neben der kolorektalen Lokalisation der Polyposis, der zum Menschen ähnliche Histologie der Adenome und der Ausprägung des Phänotypes hin zu invasiven Karzinomen, eignen sich Schweine auch zu Untersuchungen mit humanen Koloskopen (Flisikowska, Merkl et al. 2012). Ebenfalls werden durch die längere Lebensspanne der Schweine, Follow-up Untersuchungen, mit Abständen von mehreren Monaten möglich.

Jedoch muss man sagen, dass die Gewinnung von Proben sehr aufwändig ist und ein Team von mehreren Personen erfordert. Ebenfalls hat sich die Handhabung der Tiere zum Teil als schwer erwiesen, vor allem dadurch, dass die ausgewachsenen Schweine zu einem Gewicht von bis zu 300 Kg heranwachsen.

In dieser Arbeit konnte anhand des *APC*^{1311/+}- Schweinmodells gezeigt werden, dass sich CCKB- Rezeptor und Cathepsine, durch ihre Überexpression in Adenomen im Vergleich zur normalen Mukosa für die molekulare Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms eignen. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die CCKB-Rezeptor-spezifische Sonde DQ- MG- 754 in Adenomen bindet, hingegen in der normalen Mukosa kein fluoreszierendes Signal zu sehen war. Dadurch konnte deutlich gemacht werden, dass kolorektale Adenome mit Hilfe von molekularer Bildgebung auf Basis der Überexpression des CCKB- Rezeptors detektierbar wären.

Durch die Anwendung von molekularer Bildgebung in der Koloskopie könnten somit makroskopisch kaum sichtbare Adenome visualisiert und entfernt werden. Die dadurch möglicherweise noch stärkere Reduktion der Mortalität des kolorektalen Karzinoms wäre vor allem für die betroffenen Patienten und deren Angehörige von großer Bedeutung. Gleichzeitig könnten auch die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms und dadurch die Kosten für dessen Behandlung gesenkt werden. Somit könnte die Anwendung von Molekularer Bildgebung zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms, ein Gewinn für die gesamte Gesellschaft werden.

6 Zusammenfassung

In der westlichen Gesellschaft stellt Darmkrebs eine der häufigsten Krebserkrankungen mit sehr hohen Mortalitätsraten dar. Nur durch eine frühzeitige Entdeckung von Vorstufen können invasive Karzinome verhindert und eine signifikante Reduktion der Mortalität gewährleistet werden (Schoen, Pinsky et al. 2012, Nishihara, Wu et al. 2013). Die Vorsorgemethode der Wahl ist die Koloskopie, welche von allen Früherkennungsmaßnahmen die höchste Sensitivität aufweist (Quintero, Castells et al. 2012). Leider ist die Qualität der Untersuchung abhängig von der Adenom- Detektionsrate des Untersuchers. Werden kleinste Adenome übersehen, kann in den darauffolgenden Jahren ein invasives Karzinom entstehen (Kaminski, Regula et al. 2010). Zur Verbesserung der Adenom- Detektionsraten stellt die molekulare Bildgebung eine geeignete Methode dar.

In dieser Arbeit konnte anhand eines *APC^{1311/+}*- Schweinemodells gezeigt werden, dass sich der CCKB- Rezeptor und Cathepsine als Zielstrukturen für die molekulare Bildgebung zur Früherkennung des Kolonkarzinoms eignen.

Sowohl der CCKB- Rezeptor als auch die Cathepsine B, D, H, L und S wurden in Adenomen von Schweinen exprimiert. Im Vergleich mit der normalen Mukosa, konnten signifikante Überexpressionen für alle Cathepsine, außer Cathepsin L, festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich kolorektale Adenome für die Früherkennung mit Cathepsin- aktivierbaren Sonden eignen. Eine Möglichkeit der Detektion wäre durch die Cathepsin- aktivierbare Sonde ProSense möglich, mit welcher Eser et al. bereits Neoplasien im Pankreas darstellen konnten (Eser, Messer et al. 2011).

Neben der Expression des CCKB- Rezeptors in Adenomen konnte auch deren Detektierbarkeit mit der CCKBR - sensitiven Sonde, DQ- MG- 754, gezeigt werden. In Kryoschnitten der Adenome konnte die Bindung der Sonde auf mikroskopischer Ebene betrachtet werden.

In Zukunft könnten durch die Anwendung von molekularer Bildgebung in der Früherkennung des Kolonkarzinoms kleinste, makroskopisch kaum sichtbare Adenome einfacher detektiert werden. Durch diese Verbesserung der Sensitivität der Koloskopie könnten sowohl die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms als auch die Mortalität weiterhin gesenkt werden.

7 Literaturverzeichnis

R. K. I. (Robert Koch Institut, Stand 2013, 28.01.15). "Datenbankabfrage zum Krebsregister Deutschland am 28.01.2015. Ausgewählte Parameter: Diagnose_ Darmkrebs C18-C21, Statistik_Inzidenz und Mortalität, Kennzahl_Fallzahlen, Geschlecht_ Männer und Frauen, Altersgruppe_ 0-85+, Jahre_2000-2012

from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe1_node.html.

Ahn, S., A. Ansari, J. Kim, D. Kim, S. Chun, J. Kim, T. Kim, I. Park, C. Yu and S. Jang (2016). "The somatic POLE P286R mutation defines a unique subclass of colorectal cancer featuring hypermutation, representing a potential genomic biomarker for immunotherapy." Oncotarget **7**: 68638- 68649.

Bisgaard, M. L., K. Fenger, S. Bulow, E. Niebuhr and J. Mohr (1994). "Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate." Hum Mutat **3**(2): 121-125.

Boivin, G. P., K. Washington, K. Yang, J. M. Ward, T. P. Pretlow, R. Russell, D. G. Besselsen, V. L. Godfrey, T. Doetschman, W. F. Dove, H. C. Pitot, R. B. Halberg, S. H. Itzkowitz, J. Groden and R. J. Coffey (2003). "Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations." Gastroenterology **124**(3): 762-777.

Camus, M., M. Tosolini, B. Mlecnik, F. Pages, A. Kirilovsky, A. Berger, A. Costes, G. Bindea, P. Charoentong, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and J. Galon (2009). "Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence." Cancer Res **69**(6): 2685-2693.

Chan, A. T., Y. Baba, K. Shima, K. Nosho, D. C. Chung, K. E. Hung, U. Mahmood, K. Madden, K. Poss, A. Ranieri, D. Shue, R. Kucherlapati, C. S. Fuchs and S. Ogino (2010). "Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(11): 2777-2785.

Chao, C., M. L. Tallman, K. L. Ives, C. M. Townsend, Jr. and M. R. Hellmich (2005). "Gastrointestinal hormone receptors in primary human colorectal carcinomas." J Surg Res **129**(2): 313-321.

Chen, R. H. and F. McCormick (2001). "Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells." Cancer Res **61**(11): 4445-4449.

Choi, P. M. and M. P. Zelig (1994). "Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention." Gut **35**(7): 950-954.

Crabtree, M. D., I. P. Tomlinson, S. V. Hodgson, K. Neale, R. K. Phillips and R. S. Houlston (2002). "Explaining variation in familial adenomatous polyposis: relationship between genotype and phenotype and evidence for modifier genes." Gut **51**(3): 420-423.

del Re, E. C., S. Shuja, J. Cai and M. J. Murnane (2000). "Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal carcinomas." Br J Cancer **82**(7): 1317-1326.

Diamond, S. J., B. K. Enestvedt, Z. Jiang, J. L. Holub, M. Gupta, D. A. Lieberman and G. M. Eisen (2011). "Adenoma detection rate increases with each decade of life after 50 years of age." Gastrointest Endosc **74**(1): 135-140.

Drucker, A., C. Skedgel, K. Virik, D. Rayson, M. Sellon and T. Younis (2008). "The cost burden of trastuzumab and bevacizumab therapy for solid tumours in Canada." Curr Oncol **15**(3): 136-142.

- Eser, S., M. Messer, P. Eser, A. von Werder, B. Seidler, M. Bajbouj, R. Vogelmann, A. Meining, J. von Burstin, H. Algul, P. Pagel, A. E. Schnieke, I. Esposito, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur (2011). "In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(24): 9945-9950.
- Eshleman, J. R. and S. D. Markowitz (1996). "Mismatch repair defects in human carcinogenesis." Hum Mol Genet **5 Spec No**: 1489-1494.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner (1993). "The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer." Cell **75**(5): 1027-1038.
- Flisikowska, T., C. Merkl, M. Landmann, S. Eser, N. Rezaei, X. Cui, M. Kurome, V. Zakhartchenko, B. Kessler, H. Wieland, O. Rottmann, R. M. Schmid, G. Schneider, A. Kind, E. Wolf, D. Saur and A. Schnieke (2012). "A porcine model of familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **143**(5): 1173-1175.e1171-1177.
- Fu, Z., M. J. Shrubsole, W. E. Smalley, H. Wu, Z. Chen, Y. Shyr, R. M. Ness and W. Zheng (2012). "Lifestyle factors and their combined impact on the risk of colorectal polyps." Am J Epidemiol **176**(9): 766-776.
- Funkhouser, W. K., Jr., I. M. Lubin, F. A. Monzon, B. A. Zehnbauser, J. P. Evans, S. Ogino and J. A. Nowak (2012). "Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology." J Mol Diagn **14**(2): 91-103.
- Gest, H. (2005). "The early history of (32) P as a radioactive tracer in biochemical research: A personal memoir." Biochem Mol Biol Educ **33**(3): 159-164.
- Gounaris, E., C. H. Tung, C. Restaino, R. Maehr, R. Kohler, J. A. Joyce, H. L. Ploegh, T. A. Barrett, R. Weissleder and K. Khazaie (2008). "Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth." PLoS One **3**(8): e2916.
- Grandval, P., M. Blayau, M. P. Buisine, F. Coulet, C. Maugard, S. Pinson, A. Remenieras, J. Tinat, N. Uhrhammer, C. Beroud and S. Olschwang (2014). "The UMD-APC database, a model of nation-wide knowledge base: update with data from 3,581 variations." Hum Mutat **35**(5): 532-536.
- Guo, Y. S., J. Z. Cheng, G. F. Jin, J. S. Gutkind, M. R. Hellmich and C. M. Townsend, Jr. (2002). "Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **277**(50): 48755-48763.
- Guzinska-Ustymowicz, K., B. Zalewski, I. Kasacka, Z. Piotrowski and E. Skrzydlewska (2004). "Activity of cathepsin B and D in colorectal cancer: relationships with tumour budding." Anticancer Res **24**(5a): 2847-2851.
- Haberkorn, U., A. Markert, M. Eisenhut, W. Mier and A. Altmann (2011). "Development of molecular techniques for imaging and treatment of tumors." Q J Nucl Med Mol Imaging **55**(6): 655-670.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.

- Hellmich, M. R., X. L. Rui, H. L. Hellmich, R. Y. Fleming, B. M. Evers and C. M. Townsend, Jr. (2000). "Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth." J Biol Chem **275**(41): 32122-32128.
- Herbst, A., V. Jurinovic, S. Krebs, S. E. Thieme, H. Blum, B. Goke and F. T. Kolligs (2014). "Comprehensive analysis of beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/beta-catenin signaling." BMC Genomics **15**: 74.
- Herszenyi, L., L. Barabas, I. Hritz, G. Istvan and Z. Tulassay (2014). "Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression." World J Gastroenterol **20**(37): 13246-13257.
- Hopkins, R. B., R. Goeree and C. J. Longo (2010). "Estimating the national wage loss from cancer in Canada." Curr Oncol **17**(2): 40-49.
- Huang, H., N. Ansorge, H. Schrader, M. Banasch, H. G. Yu, W. E. Schmidt, M. Hocker and F. Schmitz (2007). "The CCK-2/gastrin splice variant receptor retaining intron 4 transactivates the COX-2 promoter in vitro." Regul Pept **144**(1-3): 34-42.
- Ivanovich, J. L., T. E. Read, D. J. Ciske, I. J. Kodner and A. J. Whelan (1999). "A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer." Am J Med **107**(1): 68-77.
- Jin, G., V. Ramanathan, M. Quante, G. H. Baik, X. Yang, S. S. Wang, S. Tu, S. A. Gordon, D. M. Pritchard, A. Varro, A. Shulkes and T. C. Wang (2009). "Inactivating cholecystokinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice." J Clin Invest **119**(9): 2691-2701.
- Kaminski, M. F., J. Regula, E. Kraszewska, M. Polkowski, U. Wojciechowska, J. Didkowska, M. Zwierko, M. Rupinski, M. P. Nowacki and E. Butruk (2010). "Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer." N Engl J Med **362**(19): 1795-1803.
- Kane, D. P. and P. V. Shcherbakova (2014). "A common cancer-associated DNA polymerase epsilon mutation causes an exceptionally strong mutator phenotype, indicating fidelity defects distinct from loss of proofreading." Cancer Res **74**(7): 1895-1901.
- Kane, M. F., M. Loda, G. M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J. M. Jessup and R. Kolodner (1997). "Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines." Cancer Res **57**(5): 808-811.
- Kirana, C., H. Shi, E. Laing, K. Hood, R. Miller, P. Bethwaite, J. Keating, T. W. Jordan, M. Hayes and R. Stubbs (2012). "Cathepsin D Expression in Colorectal Cancer: From Proteomic Discovery through Validation Using Western Blotting, Immunohistochemistry, and Tissue Microarrays." Int J Proteomics **2012**: 245819.
- Knudsen, A. L., M. L. Bisgaard and S. Bulow (2003). "Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature." Fam Cancer **2**(1): 43-55.
- Körner, M., B. Waser, J. C. Reubi and L. J. Miller (2010). "CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours." J Cell Mol Med **14**(4): 933-943.
- Kossatz, S., M. Behe, R. Mansi, D. Saur, P. Czerney, W. A. Kaiser and I. Hilger (2013). "Multifactorial diagnostic NIR imaging of CCK2R expressing tumors." Biomaterials **34**(21): 5172-5180.

- Kress, T. R., I. G. Cannell, A. B. Brenkman, B. Samans, M. Gaestel, P. Roepman, B. M. Burgering, M. Bushell, A. Rosenwald and M. Eilers (2011). "The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis." *Mol Cell* **41**(4): 445-457.
- Kuester, D., H. Lippert, A. Roessner and S. Krueger (2008). "The cathepsin family and their role in colorectal cancer." *Pathol Res Pract* **204**(7): 491-500.
- Lagarde, A., E. Rouleau, A. Ferrari, T. Noguchi, J. Qiu, A. Briaux, V. Bourdon, V. Remy, P. Gaildrat, J. Adelaide, D. Birnbaum, R. Lidereau, H. Sobol and S. Olschwang (2010). "Germline APC mutation spectrum derived from 863 genomic variations identified through a 15-year medical genetics service to French patients with FAP." *J Med Genet* **47**(10): 721-722.
- Lamlum, H., M. Ilyas, A. Rowan, S. Clark, V. Johnson, J. Bell, I. Frayling, J. Efstathiou, K. Pack, S. Payne, R. Roylance, P. Gorman, D. Sheer, K. Neale, R. Phillips, I. Talbot, W. Bodmer and I. Tomlinson (1999). "The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis." *Nat Med* **5**(9): 1071-1075.
- Leggett, B. and V. Whitehall (2010). "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterology* **138**(6): 2088-2100.
- Leslie, A., F. A. Carey, N. R. Pratt and R. J. Steele (2002). "The colorectal adenoma-carcinoma sequence." *Br J Surg* **89**(7): 845-860.
- Leuchs, S., A. Saalfrank, C. Merkl, T. Flisikowska, M. Edlinger, M. Durkovic, N. Rezaei, M. Kurome, V. Zakhartchenko, B. Kessler, K. Flisikowski, A. Kind, E. Wolf and A. Schnieke (2012). "Inactivation and inducible oncogenic mutation of p53 in gene targeted pigs." *PLoS One* **7**(10): e43323.
- Levi, Z., R. Kariv, I. Barnes-Kedar, Y. Goldberg, E. Half, S. Morgentern, B. Eli, H. N. Baris, A. Vilkin, R. G. Belfer, Y. Niv, R. Elhasid, R. Dvir, N. Abu-Freha and S. Cohen (2015). "The gastrointestinal manifestation of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: from a single adenoma to polyposis-like phenotype and early onset cancer." *Clin Genet* **88**(5): 474-478.
- Li, S., M. Edlinger, A. Saalfrank, K. Flisikowski, A. Tschukes, M. Kurome, V. Zakhartchenko, B. Kessler, D. Saur, A. Kind, E. Wolf, A. Schnieke and T. Flisikowska (2015). "Viable pigs with a conditionally-activated oncogenic KRAS mutation." *Transgenic Res* **24**(3): 509-517.
- Lynch, H. T., T. C. Smyrk, P. Watson, S. J. Lanspa, J. F. Lynch, P. M. Lynch, R. J. Cavalieri and C. R. Boland (1993). "Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review." *Gastroenterology* **104**(5): 1535-1549.
- MacDonald, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- Malvezzi, M., P. Bertuccio, F. Levi, C. La Vecchia and E. Negri (2014). "European cancer mortality predictions for the year 2014." *Ann Oncol* **25**(8): 1650-1656.
- Marten, K., C. Bremer, K. Khazaie, M. Sameni, B. Sloane, C. H. Tung and R. Weissleder (2002). "Detection of dysplastic intestinal adenomas using enzyme-sensing molecular beacons in mice." *Gastroenterology* **122**(2): 406-414.
- Martin-Denavit, T., S. Duthel, S. Giraud, S. Olschwang, J. C. Saurin and H. Plauchu (2001). "Phenotype variability of two FAP families with an identical APC germline mutation at codon 1465: a potential modifier effect?" *Clin Genet* **60**(2): 125-131.

- McLean, M. H., G. I. Murray, K. N. Stewart, G. Norrie, C. Mayer, G. L. Hold, J. Thomson, N. Fyfe, M. Hope, N. A. Mowat, J. E. Drew and E. M. El-Omar (2011). "The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia." PLoS One **6**(1): e15366.
- Moser, A. R., H. C. Pitot and W. F. Dove (1990). "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse." Science **247**(4940): 322-324.
- Nishihara, R., K. Wu, P. Lochhead, T. Morikawa, X. Liao, Z. R. Qian, K. Inamura, S. A. Kim, A. Kuchiba, M. Yamauchi, Y. Imamura, W. C. Willett, B. A. Rosner, C. S. Fuchs, E. Giovannucci, S. Ogino and A. T. Chan (2013). "Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy." N Engl J Med **369**(12): 1095-1105.
- O'Brien, M. J. (2007). "Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum." Gastroenterol Clin North Am **36**(4): 947-968, viii.
- O'Brien, M. J., Q. Zhao and S. Yang (2015). "Colorectal serrated pathway cancers and precursors." Histopathology **66**(1): 49-65.
- Okabayashi, K., H. Ashrafian, H. Hasegawa, J. H. Yoo, V. M. Patel, L. Harling, S. P. Rowland, M. Ali, Y. Kitagawa, A. Darzi and T. Athanasiou (2012). "Body mass index category as a risk factor for colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis." Am J Gastroenterol **107**(8): 1175-1185; quiz 1186.
- Quintero, E., A. Castells, L. Bujanda, J. Cubiella, D. Salas, A. Lanas, M. Andreu, F. Carballo, J. D. Morillas, C. Hernandez, R. Jover, I. Montalvo, J. Arenas, E. Laredo, V. Hernandez, F. Iglesias, E. Cid, R. Zubizarreta, T. Sala, M. Ponce, M. Andres, G. Teruel, A. Peris, M. P. Roncales, M. Polo-Tomas, X. Bessa, O. Ferrer-Armengou, J. Grau, A. Serradesanferm, A. Ono, J. Cruzado, F. Perez-Riquelme, I. Alonso-Abreu, M. de la Vega-Prieto, J. M. Reyes-Melian, G. Cacho, J. Diaz-Tasende, A. Herreros-de-Tejada, C. Poves, C. Santander and A. Gonzalez-Navarro (2012). "Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening." N Engl J Med **366**(8): 697-706.
- Reubi, J. C., J. C. Schaer and B. Waser (1997). "Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors." Cancer Res **57**(7): 1377-1386.
- Roy, J., K. S. Putt, D. Coppola, M. E. Leon, F. K. Khalil, B. A. Centeno, N. Clark, V. E. Stark, D. L. Morse and P. S. Low (2016). "Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue." Oncotarget **7**(12): 14605-14615.
- Scatliff, J. H. and P. J. Morris (2014). "From Roentgen to magnetic resonance imaging: the history of medical imaging." N C Med J **75**(2): 111-113.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
- Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer and M. W. Reed (2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods." Anal Biochem **285**(2): 194-204.
- Schmitz, F., J. M. Otte, H. U. Stechele, B. Reimann, T. Banasiewicz, U. R. Folsch, W. E. Schmidt and K. H. Herzig (2001). "CCK-B/gastrin receptors in human colorectal cancer." Eur J Clin Invest **31**(9): 812-820.
- Schoen, R. E., P. F. Pinsky, J. L. Weissfeld, L. A. Yokochi, T. Church, A. O. Laiyemo, R. Bresalier, G. L. Andriole, S. S. Buys, E. D. Crawford, M. N. Fouad, C. Isaacs, C. C. Johnson, D. J. Reding, B. O'Brien, D.

- M. Carrick, P. Wright, T. L. Riley, M. P. Purdue, G. Izmirlian, B. S. Kramer, A. B. Miller, J. K. Gohagan, P. C. Prorok and C. D. Berg (2012). "Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy." N Engl J Med **366**(25): 2345-2357.
- Seal, B. S., S. D. Sullivan, S. Ramsey, K. M. Shermock, J. Ren, C. Kreilick, S. H. Foltz Boklage, S. Valluri, S. Sarma and C. V. Asche (2013). "Medical costs associated with use of systemic therapy in adults with colorectal cancer." J Manag Care Pharm **19**(6): 461-467.
- Sharma, P., N. Gupta, E. J. Kuipers, A. Repici and M. Wallace (2014). "Advanced imaging in colonoscopy and its impact on quality." Gastrointest Endosc **79**(1): 28-36.
- Shinya, H. and W. I. Wolff (1979). "Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps." Ann Surg **190**(6): 679-683.
- Shussman, N. and S. D. Wexner (2014). "Colorectal polyps and polyposis syndromes." Gastroenterol Rep (Oxf) **2**(1): 1-15.
- Smith, A. M. and S. A. Watson (2000). "Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence." Gut **47**(6): 820-824.
- Stigliano, V., L. Sanchez-Mete, A. Martayan and M. Anti (2014). "Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease?" World J Gastroenterol **20**(35): 12420-12430.
- Talieri, M., S. Papadopoulou, A. Scorilas, D. Xynopoulos, N. Arnogianaki, G. Plataniotis, J. Yotis and N. Agnanti (2004). "Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma." Cancer Lett **205**(1): 97-106.
- Ter-Pogossian, M. M., M. E. Phelps, E. J. Hoffman and N. A. Mullani (1975). "A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT)." Radiology **114**(1): 89-98.
- van Hees, F., J. D. Habbema, R. G. Meester, I. Lansdorp-Vogelaar, M. van Ballegooijen and A. G. Zauber (2014). "Should colorectal cancer screening be considered in elderly persons without previous screening? A cost-effectiveness analysis." Ann Intern Med **160**(11): 750-759.
- Vasen, H. F., G. Moslein, A. Alonso, S. Aretz, I. Bernstein, L. Bertario, I. Blanco, S. Bulow, J. Burn, G. Capella, C. Colas, C. Engel, I. Frayling, W. Friedl, F. J. Hes, S. Hodgson, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, P. Moller, T. Myrhoi, F. M. Nagengast, Y. Parc, R. Phillips, S. K. Clark, M. P. de Leon, L. Renkonen-Sinisalo, J. R. Sampson, A. Stormorken, S. Tejpar, H. J. Thomas and J. Wijnen (2008). "Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)." Gut **57**(5): 704-713.
- Weiss, P. and J. L. Kavanau (1957). "A model of growth and growth control in mathematical terms." J Gen Physiol **41**(1): 1-47.
- Willard, M. D., M. E. Lajiness, I. H. Wulur, B. Feng, M. L. Swearingen, M. T. Uhlik, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, T. Sjoblom, S. D. Markowitz, S. M. Powell, B. Vogelstein and T. D. Barber (2012). "Somatic mutations in CCK2R alter receptor activity that promote oncogenic phenotypes." Mol Cancer Res **10**(6): 739-749.
- Yabroff, K. R. and Y. Kim (2009). "Time costs associated with informal caregiving for cancer survivors." Cancer **115**(18 Suppl): 4362-4373.
- Yu, H. G., S. L. Tong, Y. M. Ding, J. Ding, X. M. Fang, X. F. Zhang, Z. J. Liu, Y. H. Zhou, Q. S. Liu, H. S. Luo and J. P. Yu (2006). "Enhanced expression of cholecystokinin-2 receptor promotes the progression of colon cancer through activation of focal adhesion kinase." Int J Cancer **119**(12): 2724-2732.

Zauber, A. G., S. J. Winawer, M. J. O'Brien, I. Lansdorp-Vogelaar, M. van Ballegooijen, B. F. Hankey, W. Shi, J. H. Bond, M. Schapiro, J. F. Panish, E. T. Stewart and J. D. Waye (2012). "Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths." N Engl J Med 366(8): 687-696.

Zeineldin, M. and K. L. Neufeld (2013). "Understanding phenotypic variation in rodent models with germline Apc mutations." *Cancer Res* 73(8): 2389-2399.

Zhang, H., D. Morgan, G. Cecil, A. Burkholder, N. Ramocki, B. Scull and P. K. Lund (2008). "Biochromoendoscopy: molecular imaging with capsule endoscopy for detection of adenomas of the GI tract." *Gastrointest Endosc* 68(3): 520-527.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation, in unterschiedlicher Weise, unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. R. M. Schmid, für die Arbeitsmöglichkeit und die Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Saur, für das Überlassen des Themas, der guten Betreuung, der geduldigen Besprechung von Ergebnissen und Unterstützung zu jeder Zeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. Barbara Seidler, für die großartige Hilfe bei dem designen der Primer, bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Frau Dr. med. vet. Katja Steiger, für ihre Hilfe bei der Handhabung des konfokalen Mikroskops.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Saur und Schneider, für meine freundliche Aufnahme ins Labor- Team, und der stetigen Hilfsbereitschaft, bedanken. Hier gilt ein besonderer Dank meinen Labor-Kolleginnen Frau Magdalena Zukowska, Frau Ph.D. Natasa Stojanovic und Frau Regina Christ, für das Zeigen von Methoden, dem geduldigen Beantworten meiner Fragen und der regen Diskussion meiner Ergebnisse.

Auch gilt ein großes Dankeschön Herrn Paul Kohlhaas, für viel Geduld und Hilfe bei dem Erstellen der Graphiken dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meiner Oma bedanken. Vielen Dank, für eure großartige Unterstützung während meines ganzen Studiums.