

Experimental and Clinical Research Center,
Charité – Universitätsmedizin Berlin,
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

DISSERTATION

In-vivo-Imaging der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom
in einem Xenograft-Mausmodell –
Einfluss des neuidentifizierten Metastasierungsgens MACC1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andreas Pichorner

aus Berlin

Diese Arbeit wurde angefertigt am Experimental and Clinical Research Center, Charité – Universitätsmedizin Berlin, am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin unter der Betreuung von Prof. Dr. Ulrike Stein (AG Metastasierung und Therapie-Response in der FG Chirurgische Onkologie)

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. U. Stein
 2. Prof. Dr. med. Dr. h. c. P. M. Schlag
 3. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr

Datum der Promotion: 03.06.2012

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Definition des kolorektalen Karzinoms	1
1.2	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.3	Ätiologie des kolorektalen Karzinoms	2
1.4	Pathologie	4
1.4.1	<i>Makroskopie und Histologie des Dickdarms</i>	4
1.4.2	<i>Pathogenese</i>	5
1.4.3	<i>Morphologie des kolorektalen Karzinoms</i>	8
1.4.4	<i>Metastasierung</i>	8
1.5	Diagnostisches Vorgehen und Staging	12
1.6	Systemische Therapie des kolorektalen Karzinoms	15
1.7	Verlauf und Prognose	16
1.8	MACC1	17
1.8.1	<i>Putative Domänenstruktur</i>	18
1.8.2	<i>Die Rolle von MACC1 im HGF/Met-Pathway</i>	19
1.8.3	<i>Metastasierungsprognose mit MACC1 als molekularem Marker</i>	21
1.9	Zielstellung	22
2.	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	<i>Chemikalien und Puffer</i>	24
2.1.2	<i>Zellkultur</i>	25
2.1.3	<i>PCR und RT-PCR</i>	25
2.1.4	<i>Oligonukleotidsequenzen</i>	26
2.1.5	<i>Kits und Enzyme</i>	26
2.1.6	<i>Vektoren und Zelllinien</i>	27
2.1.7	<i>Geräte</i>	28
2.2	Klonierung und Restriktionsenzymverdau	29
2.3	Stabile Transfektion	30
2.4	Luciferaseaktivitäts-Assay	31

2.5	Isolierung von RNA	32
2.6	Quantitative real-time RT-PCR	33
2.7	Western Blot	35
2.8	Migrations-Assay	37
2.9	Invasions-Assay	38
2.10	In-vivo-Biolumineszenz-Imaging	39
2.10.1	<i>Versuchstiere</i>	39
2.10.2	<i>Intrasplenale Injektion</i>	40
2.10.3	<i>Biolumineszenz-Messung</i>	40
2.11	Statistische Analysen	41
3.	ERGEBNISSE	42
3.1	Klonierung der pIRES-Konstrukte	42
3.1.1	<i>Klonierung von Luciferase-IRES</i>	42
3.1.2	<i>Klonierung von Luciferase-IRES-MACC1ΔSH3</i>	43
3.1.3	<i>Klonierung von Luciferase-IRES-MACC1</i>	45
3.2	Expressionsanalysen	46
3.2.1	<i>Steigerung der Luciferaseaktivität in den stabilen Zellklonen</i>	46
3.2.2	<i>Steigerung der MACC1-Transkription und -Translation</i>	47
3.3	Motilitätsanalysen	48
3.3.1	<i>Migrationsinduktion durch MACC1</i>	49
3.3.2	<i>Invasionsinduktion durch MACC1</i>	49
3.4	In-vivo-Imaging des Xenograft-Mausmodells	51
3.4.1	<i>In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit dem Kontrollkonstrukt Luciferase-IRES</i>	52
3.4.2	<i>In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit MACC1ΔSH3</i>	54
3.4.3	<i>In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit MACC1</i>	56
4.	DISKUSSION	60
4.1	Bedeutung der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom	60
4.2	Bedeutung von MACC1 als metastasierungsinduzierendes Gen	61
4.3	pIRES-Konstrukte exprimieren Luciferase und MACC1	63
4.4	MACC1 steigert migratorisches und invasives Potential	67

4.5	Biolumineszenz-Signal ist suffizient für non-invasives Imaging	69
4.6	MACC1 führt zu einem gesteigerten Wachstum des Primärtumors	73
4.7	MACC1 erhöht die Metastaselast	74
4.8	Ausblick	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	LITERATURVERZEICHNIS	82
	LEBENS LAUF	89
	WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	90
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	91
	DANKSAGUNG	92

Verzeichnis der Abkürzungen

A.	Arteria
AJCC	American Joint Committee On Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CIN	Chromosomale Instabilität
c-myc	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
CCD-Kamera	Charge-Coupled Device Kamera
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DCC	Deleted In Colorectal Carcinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix
EC-Zellen	Enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FIT	Fecal Immunochemical Test
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Fwd	Forward
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
gFOBT	Guaiac Fecal Occult Blood Test
GOI	Gene of Interest
HGF	Hepatocyte-Growth-Factor
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HUGO	Human Genome Organisation
IRES	Internal Ribosome Entry Site

JNK	Jun Amino-Terminal Kinase
K-Ras	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LC-Red 640	LightCycler [®] Red 640
MACC1	Metastasis Associated in Colon Cancer 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCS	Multiple Cloning Site
MEK	MAPK/ERK Kinase
MR	Magnetresonanz
MSI	Mikrosatelliten Instabilität
OS	Overall Survival
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFS	Progression Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase
PXXP	Prolinreiches Motiv
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
R0	Vollständige Resektion des Primärtumors
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SMAD	Similar To Mothers Against Decapentaplegic
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween [®] 20
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNM	Tumor-Node-Metastasis-Classification
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

1. EINLEITUNG

1.1 Definition des kolorektalen Karzinoms

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (KRK) versteht man einen malignen Tumor im Bereich des Kolons bzw. Rektums, bei dem es sich in 95% der Fälle um ein Adenokarzinom handelt. Vergleichsweise selten sind im Dickdarm Lymphome, Sarkome oder Karzinoide zu finden.¹

Von einem Adenokarzinom spricht man histologisch ab einer High-grade Dysplasie eines Adenoms mit Infiltration der Submucosa.²

1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern in Deutschland die zweithäufigste Krebsart. Bei Frauen sind nur das Mammakarzinom und bei Männern das Lungenkarzinom häufiger. Darüber hinaus ist das kolorektale Karzinom bei beiden Geschlechtern auch die Tumorentität, die die zweithäufigste Krebstodesursache darstellt.³ Deutschland liegt dabei im globalen Trend, denn weltweit betrachtet ist das kolorektale Karzinom mit 655.000 Fällen pro Jahr in der westlichen Welt die dritthäufigste Krebsart und führt von allen Krebsarten am zweithäufigsten zum Tode.⁴

Die jährlichen Neuerkrankungen liegen in Deutschland etwa bei 36.000 Fällen für Männer und bei 32.000 Fällen für Frauen.³

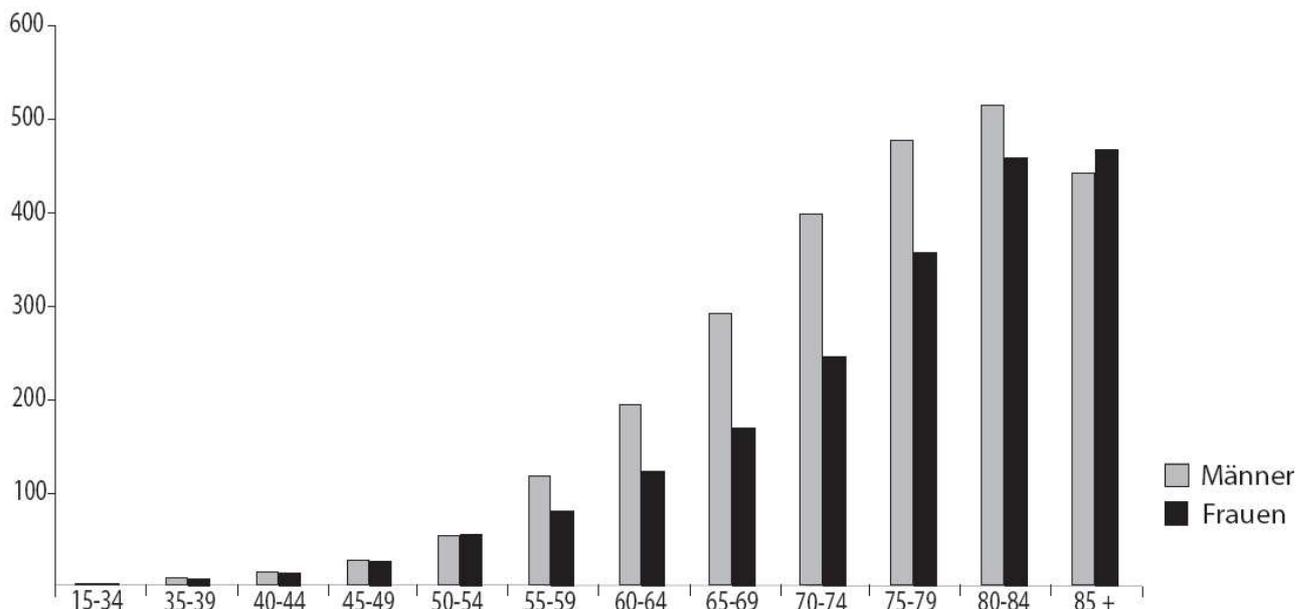


Abb. 1.1: Altersspezifische KRK-Inzidenz in Deutschland 2006, Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen. Nach Robert-Koch-Institut (RKI) - Krebs in Deutschland – Auflage 2010.³

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist in den letzten Jahren stark angestiegen. 1980 betrug die Inzidenz bei Männern in Deutschland noch 50 pro 100.000 Einwohner und bei Frauen 39. Im Jahr 2000 hingegen waren es bei den Männern schon 75 und bei den Frauen 53 Fälle pro 100.000 Einwohner.³

Betrachtet man die Neuerkrankungsrate im internationalen Vergleich, so kommt Deutschland für das Jahr 2006 in der globalen Statistik bei den Frauen auf Platz fünf und bei den Männern sogar auf Platz drei.³ Das kolorektale Karzinom ist also auch aus volkswirtschaftlicher Sicht für Deutschland von besonderem Interesse.

Der Anstieg der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist einerseits durch Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten zu erklären, aber andererseits auch durch Veränderungen der Altersverteilung in der Bevölkerung.⁵ Durch den demographischen Wandel in der Bevölkerung der entwickelten Länder ist der Anteil älterer Bevölkerungsgruppen stetig angestiegen. Da die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms eine Multistep-Karzinogenese darstellt, die mehrerer hintereinander ablaufender Schritte bedarf, steigt mit Zunahme der Lebenszeit die Wahrscheinlichkeit für eine Akkumulation dieser notwendigen Zwischenschritte an.

1.3 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind verschiedene endogene und exogene Risikofaktoren definiert. Der Einfluss von exogenen Risikofaktoren scheint hierbei zu dominieren. Dies geht aus Untersuchungen hervor, bei denen man die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Populationen mit großen geographischen und kulturellen Unterschieden sowie bei Migranten betrachtet hat. Es stellte sich heraus, dass Einwanderer aus Ländern mit einer niedrigen Inzidenz für das kolorektale Karzinom in ein Land mit hoher Inzidenz nach nur einer Generationsabfolge die Inzidenz ihres Gastlandes erwerben.⁶ Dies macht deutlich, dass vor allem der Lebensstil und die individuelle Ernährungsweise maßgeblich an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt sind. Die bakterielle Gärung und Fermentierung von zugeführten Nahrungsstoffen, die dadurch bedingt in potenziell kanzerogene Substanzen umgeformt werden, könnten eine Ursache sein und würden auch die protektive Wirkung von Ballaststoffen erklären, die die Kontaktzeit dieser potenziell kanzerogen wirkenden Substanzen mit der Colonmucosa verkürzen.⁷

Es wurde nachgewiesen, dass es bestimmte Risiko- und Protektivfaktoren gibt, die genetischen, ethnischen, diätischen und endogen-metabolischen Ursprung sind. Zur Erfassung der endogenen Risikofaktoren kann man eine Einteilung in drei Risikogruppen vollziehen. Personen, die einer dieser drei Risikogruppen angehören, haben aufgrund einer besonderen Prädisposition ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Die drei Risikogruppen beinhalten 1. Personen mit einem individuell gesteigerten Risiko für ein sporadisches kolorektales Karzinom, 2. Personen mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung und 3. Anlageträger für ein hereditäres kolorektales Karzinom.⁸ Zu Personen mit einem individuell gesteigerten Risiko für ein sporadisches kolorektales Karzinom gehören Verwandte ersten Grades mit einem kolorektalen Karzinom oder eines Adenoms oder Patienten, bei denen ein Adenom nachgewiesen wurde, auch wenn es rezidiert werden konnte.^{9 10} Für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte vor allem bei Vorliegen der Colitis ulcerosa eine Risikoerhöhung für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden, aber auch Morbus Crohn ist als potenzieller Risikofaktor anzusehen.¹¹ Zusätzlich erhöht wird das Risiko eines kolorektalen Karzinoms auch durch das Vorhandensein einer primär sklerosierenden Cholangitis.¹²

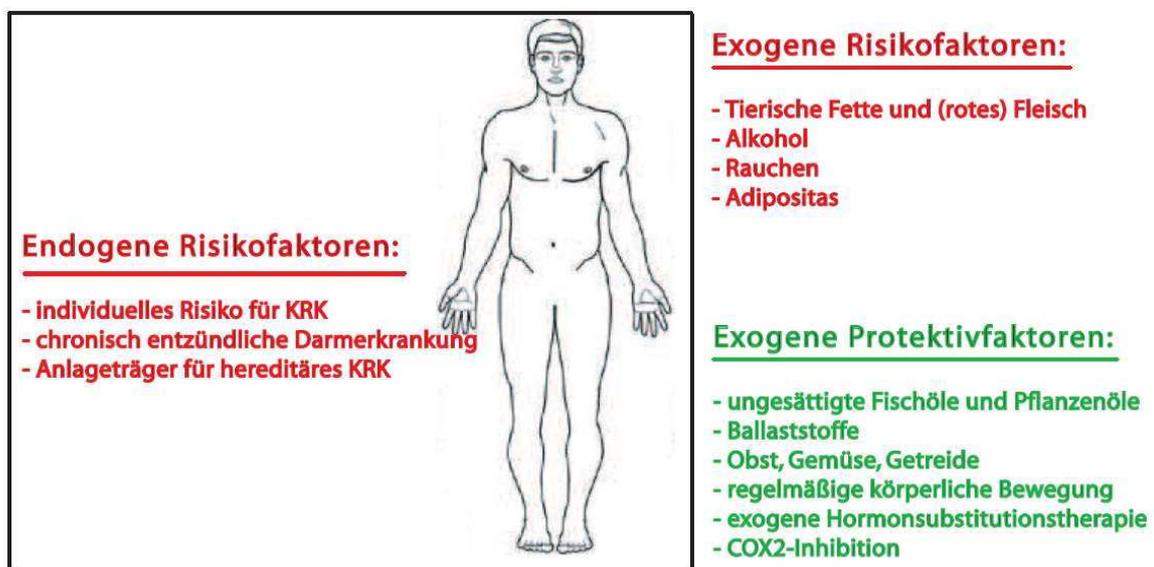


Abb. 1.2: Faktoren, die auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms risikosteigernde oder protektive Wirkungen ausüben können. Zu vielen Faktoren gibt es in Studien teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb seien nur die erwähnt, die sich auch in den aktuellen Empfehlungen der WHO, der American Cancer Society und der Deutschen Gesellschaft für Ernährung wiederfinden. Als zwei weitere interessante Ansätze für exogene Protektivfaktoren seien die Hormonsubstitution und die selektive COX 2-Inhibition genannt. Nach Hawk et al.¹³

1.4 Pathologie

1.4.1 Makroskopie und Histologie des Dickdarms

Im Dickdarm wird der Speisebrei durch Wasserentzug eingedickt, nachdem im Dünndarm ein Großteil der Nahrungsresorption erfolgt ist. Zusätzlich wird dem Speisebrei durch die Becherzellen Schleim beigemischt, um ihn für die Ausscheidung gleitfähiger zu machen.

Die makroskopischen Merkmale sind die Tánien, Haustren und Appendices epiploicae.¹⁴ Die Tánien bestehen aus drei ca. 1 cm breiten Längsmuskelstreifen. Die Tánia libera liegt frei und ist mit bloßem Auge gut sichtbar. Die beiden anderen Tánien (Tánia omentalis und Tánia mesocolica) werden durch den Ursprung des Omentum majus oder den Ansatz des Mesenteriums verdeckt.

Die Haustren sind halbkugelförmige Ausbuchtungen, die durch Einschnürungen (Plicae semilunares coli) voneinander getrennt sind. Es handelt sich dabei um rein funktionelle Gebilde, die die Segmentationsbewegungen und die Peristaltik unterstützen.

Bei den Appendices epiploicae coli handelt es sich um Fettanhängsel in der submukösen und in der subserösen Verschiebeschicht, deren Größe je nach Ernährungszustand individuell variieren kann.

Der Dickdarm gliedert sich in drei Abschnitte: Caecum (Blinddarm), Colon (Grimmdarm) und Rectum (Mastdarm). Das Caecum ist mit etwa 7 cm Länge ein sehr kurzer Abschnitt. Es beginnt direkt hinter der Bauhin-Klappe und an ihm entspringt die Appendix vermiformis (Wurmfortsatz).

Das Colon ist ca. 1 m lang und wird je nach Lage und Peritonealverhältnissen in vier Abschnitte gegliedert (Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens und Colon sigmoideum). Das Colon ascendens erstreckt sich zwischen Caecum und rechter Kolonflexur und liegt sekundär retroperitoneal. Das Colon transversum liegt intraperitoneal zwischen rechter und linker Kolonflexur. Das Colon descendens befindet sich wieder sekundär retroperitoneal bis zum Beginn des Colon sigmoideum, das s-förmig in das Rectum übergeht und intraperitoneal gelegen ist.

Die Blutversorgung des Dickdarms erfolgt durch die A. mesenterica superior und A. mesenterica inferior, die beide aus der Aorta entspringen. Beide Arterien ziehen am Dickdarm als Gefäßarkaden entlang. Ihre Versorgungsgebiete gehen am Colon transversum ineinander über, wobei die A. mesenterica superior die rechts gelegenen Dickdarmabschnitte versorgt und die A. mesenterica inferior die links gelegenen.

Der Wandaufbau des Dickdarms entspricht in seiner Gliederung dem des restlichen Verdauungskanals. Von innen nach außen unterscheidet man die Mucosa (bestehend aus Epithel, Lamina propria und Muscularis mucosae), die Submucosa, die den Plexus submucosus enthält und die Muscularis bestehend aus Ring- und Längsmuskelschicht.¹⁵ Zwischen Ring- und Längsmuskelschicht befindet sich der Plexus myentericus. Zusammen mit dem Plexus submucosus bildet er das enterische Nervensystem. Das enterische Nervensystem unterliegt Einflüssen des vegetativen Nervensystems (Parasympathikus und Sympathikus), verleiht dem Verdauungskanal jedoch weitgehende funktionelle Autonomie. Die intraperitonealen Anteile des Dickdarms sind zudem durch die Serosa überzogen, die das Bauchfell bildet. Extra- oder retroperitoneal gelegene Anteile besitzen keinen Serosaüberzug und sind durch die Adventitia, die aus lockerem Bindegewebe besteht, in der Umgebung verankert.

Die Mucosa des Dickdarms besitzt anders als im Dünndarm keine Zotten, sondern Krypten. Sie wird von einem einschichtigen Zylinderepithel, bestehend aus mikrovillitragenden Saumzellen, ausgekleidet. Zusätzlich sind in der Mucosa zahlreiche Becherzellen enthalten, um die nötige Schleimproduktion zu gewährleisten, und enteroendokrine Zellen, die Serotonin sezernieren.

Das Epithel der Dickdarmmucosa ist ein sich permanent regenerierendes Gewebe. Die Erneuerung des Epithels erfolgt durch im Kryptenfundusbereich gelegene Stammzellen.¹⁶ Diese bilden die hochproliferativen Vorläuferzellen, die nach 3-4 Mitosen die Proliferation einstellen und sich in eine der drei im Epithel vorkommenden Zelltypen differenzieren (Enterozyten, Becherzellen oder enteroendokrine Zellen). Am Kryptenapex gehen die Epithelzellen nach ca. 5 Tagen in die Apoptose über und werden abgeschilfert und dem Stuhl beigemischt.

Das kurze Zelleben im Dickdarmepithel und der ständige Ersatz vom Kryptenfundus aus machen deutlich, dass dafür ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose essentiell ist.¹⁷ Dysregulationen führen zu Neoplasien, die mit der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms stark assoziiert sind.¹⁸

1.4.2 Pathogenese

Das sporadische kolorektale Karzinom durchläuft in seiner Pathogenese histologisch und makroskopisch nachweisbare Veränderungen, die auf molekularen Veränderungen beruhen. Morson et al. definierten 1974 den Begriff der Adenom-Karzinom-Sequenz

und beschrieben damit die Entstehung eines invasiven kolorektalen Karzinoms über adenomatöse Zwischenstufen.¹⁹ Fearon und Vogelstein untermauerten 1990 dieses Modell durch die Zuordnung von genetischen Aberrationen zu den einzelnen Zwischenstufen der kolorektalen Karzinogenese.²⁰ Als Modellerkrankungen dienten dabei die beiden hereditären Kolonkarzinomsyndrome FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) und HNPCC (hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom).²¹ Dieses Modell wird mittlerweile als zu starr angesehen, um die komplexen Vorgänge der molekularen Pathogenese des kolorektalen Karzinoms zu beschreiben, jedoch kann man damit frühe (APC- und Ras-Mutation) und späte genetische Veränderungen (p53-Mutation) der kolorektalen Karzinogenese unterscheiden. Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms um eine Multistep-Karzinogenese handelt, die aufgrund von genetischen Mutationen die Adenom-Karzinom-Sequenz durchläuft. Diese Multistep-Karzinogenese kann über verschiedene Wege ablaufen. Die beiden klassischen Pathways sind der Chromosomeninstabilitäts-Pathway (CIN-Pathway) und der Mikrosatelliteninstabilitäts-Pathway (MSI-Pathway). Der CIN-Pathway ist in über 80% der kolorektalen Karzinome an der Entstehung beteiligt. Bei der CIN kommt es zu chromosomalen Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und in Onkogenen wie K-Ras, APC, DCC und p53. Daraus resultieren eine Aneuploidie und chromosomale Instabilität.

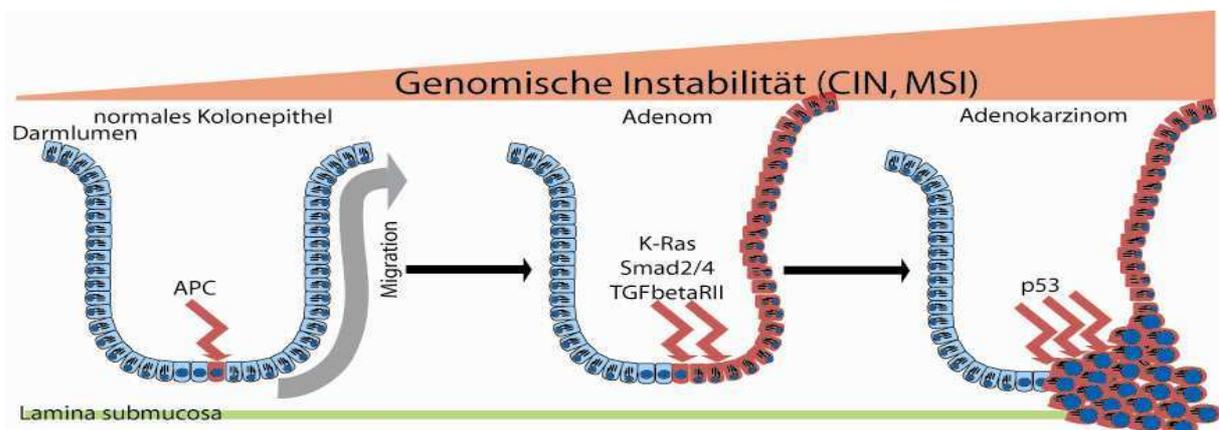


Abb. 1.3: Die Adenom-Karzinom-Sequenz. In der Multistep-Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms sind verschiedene genetische Veränderungen nötig. Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz ist etwas starr. Jedoch können frühe genetische Veränderungen (in der Initiation) und späte genetische Veränderungen (in der Progression) grob unterteilt werden. Nach Fearon et al., Sancho et al.^{20 22}

Der MSI-Pathway ist mit nur 15% Beteiligung an kolorektalen Karzinomen weitaus seltener. Hierbei liegt ein DNA-Reparaturdefekt durch Mutationen in Mismatchreparaturgenen zugrunde. Die am häufigsten mutierten Mismatchreparaturgene sind MSH2, MLH1, MSH6 und PMS2.²³ Durch deren Mutation kommt es zu einer fehlerhaften DNA-Replikation im Bereich repetitiver kurzer DNA-Fragmente (Mikrosatelliten). Dies führt zu einem veränderten Mikrosatellitenmuster und zur Instabilität. Folge der Mikrosatelliteninstabilität ist dann die Akkumulation von Mutationen in multiplen Genen. Neben diesen beiden klassischen Wegen der kolorektalen Karzinogenese werden auch noch andere Wege beschrieben, wobei besonders die kolitisassoziierte Karzinogenese von Bedeutung ist.²⁴

Für die histologische Pathogenese des Adenoms existieren zwei Modelle: das Top-down- und das Bottom-up-Modell. Sie beschreiben unterschiedliche Ursprungsorte in den kolorektalen Krypten bei der Adenomentstehung. Adenome, die in 90% der Fälle benigne Vorstufen des kolorektalen Karzinoms sind, beruhen auf Störungen des Zellzyklus, wodurch die Proliferation gestärkt und die Apoptose geschwächt werden. Das Top-down-Modell beschreibt eine Transformation von Epithelzellen am Kryptenapex, die sich nach lateral und die Krypten hinabsteigend ausbreitet und auf diese Weise auch das Epithel in den Krypten umwandelt. Das Bottom-up-Modell hingegen geht von einer klonalen Expansion im Kryptenfundus aus, die zu einem überproportionalen Wachstum entlang der Krypten in Richtung Apex führt.

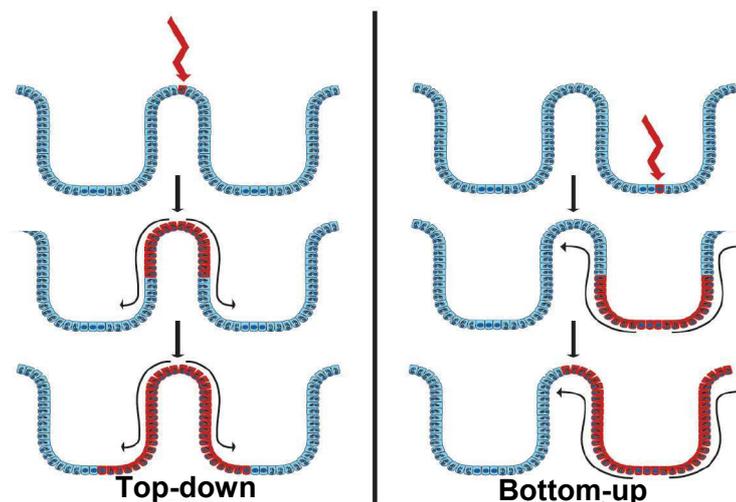


Abb. 1.4: Top-down- und Bottom-up-Modell. Das Top-down Modell geht davon aus, dass die zur Tumorentstehung notwendigen genetischen Alterationen in den ausgereiften Zellen im Kryptenapex stattfinden und sich von dort aus lateral ausbreiten. Es stützt sich vor allem auf histologische Auswertungen kolorektaler Karzinome in frühen Entwicklungsstadien. Das Bottom-up-Modell geht hingegen von einer Tumorentstehung aus unreifen Stammzellen aus, die sich im Kryptenfundus befinden. Zurzeit spricht die Studienlage eher für das Bottom-up-Modell als Ursprung.²⁵ Nach Shih et al.²⁶

1.4.3 Morphologie des kolorektalen Karzinoms

Makroskopisch unterscheidet man beim kolorektalen Karzinom drei verschiedene Wachstumsformen: polypös bzw. papillär exophytisch, infiltrativ-ulzerierend und zirkulär-stenosierend. Die polypös bzw. papillär exophytische Form beschreibt einen blumenkohlartigen Tumor, der zur gesunden Darmschleimhaut scharf begrenzt ist. Bei der infiltrativ-ulzerierenden Form weist der Tumor eine zentrale Ulzeration und kraterartig aufgeworfene Ränder auf. Die makroskopische Zuordnung hat jedoch für die therapeutische Planung keine Relevanz. Für die Therapie entscheidender ist die histologische Typisierung des kolorektalen Karzinoms. Der häufigste histologische Typ ist in 95% der Fälle das Adenokarzinom.¹ Dabei unterscheidet man zwischen einem tubulären, azinären, papillären und muzinösen Adenokarzinom. Das muzinöse Adenokarzinom wird auch Gallertkarzinom genannt und ist durch eine massive Schleimproduktion gekennzeichnet. Es ist zudem häufig mit einer Colitis ulcerosa assoziiert. Weitaus seltener als das Adenokarzinom sind das Siegelringkarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das adenosquamöse Karzinom, das kleinzellige Karzinom und das undifferenzierte Karzinom im Dickdarm anzutreffen.²⁷

1.4.4 Metastasierung

Das Überleben eines Patienten mit kolorektalem Karzinom ist meist nicht vom Primärtumor, sondern von der Entwicklung von Metastasen abhängig. Die Therapieoptionen des Primärtumors sind zumeist durch chirurgische Optionen effektiver als die der Metastasen. Die chirurgische Intervention von Metastasen ist indiziert, wenn es sich um primär resektable Lungen- oder Lebermetastasen handelt, da Patienten davon meist profitieren. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach R0-Resektion pulmonaler Metastasen schwankt beispielsweise zwischen 32,4% und 50,3%.²⁸ Jedoch bedeutet dies nicht immer einen Benefit in Bezug auf die Lebensqualität des Patienten, die durch einen Eingriff stark beeinträchtigt werden kann. Daher sollte prinzipiell über die Resektabilität individuell von Patient zu Patient durch eine interdisziplinäre Tumorkonferenz entschieden werden. Als Kernpunkte im Falle einer pulmonalen Metastasierung sollte die Anzahl und Lokalisation der Metastasen, der Grad etwaiger vorhandener pulmonaler Vorschädigungen und das zu erwartende Residualvolumen nach Resektion diskutiert werden. Die Resektabilität von Lebermetastasen ist dann gegeben, wenn eine nicht resektable extrahepatische Tumormanifestation

ausgeschlossen ist, weniger als 70% des Parenchyms befallen sind, weniger als drei Lebervenen und weniger als sieben Segmente betroffen sind, keine Leberinsuffizienz oder Zirrhose der Child-Pugh-Klasse B oder C vorliegen und keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen vorhanden sind.²⁹

Eine adjuvante Therapie kann bei primär resektablen Metastasen erwogen werden und eine neoadjuvante Therapie in Ausnahmefällen.³⁰ Ein adjuvanter Therapieansatz dient der Reduktion der Tumorlast nach erfolgter Resektion und der Bekämpfung von metastatischen Zellverbänden. Ein neoadjuvanter Therapieansatz dient der Reduktion der Tumorlast vor einer geplanten chirurgischen Resektion.

Grundsätzlich ist darüber hinaus eine systemische Chemotherapie indiziert bei Patienten mit Leber- oder Lungenmetastasen, die nach einer neoadjuvanten Behandlung potenziell resektabel werden können, bei Patienten mit tumorbedingten Symptomen oder raschem Progress und bei Patienten mit multiplen Metastasen, bei denen eine Resektion nicht möglich erscheint. Im Falle eines palliativen Therapieansatzes wird das mediane Gesamtüberleben zwar nur moderat verlängert, aber zumindest statistisch signifikant.³¹

Die Therapieoptionen beim metastasierten kolorektalen Karzinom sind sehr erschwert und werfen viele Probleme und Fragen auf, da die Entscheidungsfindung für eine individuell geplante Therapie von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Eine effektive Therapie im metastasierten Tumorstadium ist jedoch von großer Bedeutung, denn das Wachstum der Metastasen, paraneoplastische Syndrome und Komplikationen im Rahmen der Therapie selbst limitieren die Überlebensrate der Patienten im starken Maße.

Durch die Erforschung der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms soll das Verständnis für die molekularen Grundlagen der notwendigen Zwischenschritte, die zur Ausbildung von Metastasen führen, verbessert werden. Dadurch können neue Therapieoptionen entwickelt werden, die sich direkt gegen die Metastasierung richten und damit den mortalitätsbestimmenden Faktor effektiv bekämpfen.

Die Abfolge der einzelnen Zwischenschritte, die zur Metastasierung führen, ist mittlerweile gut beschrieben. Zuerst muss der Primärtumor durch Invasion Zugang zu Blutgefäßen erhalten, durch die seine Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet wird und in die metastatische Zellen eindringen können (Intravasation). Im Blutkreislauf muss es den Zellen dann gelingen zu überleben und in den Kapillaren der distanten

Zielorgane zu arretieren, um dort den Blutkreislauf wieder zu verlassen (Extravasation). Im distanten Organ müssen die metastatischen Zellen proliferieren und die Angiogenese anregen, um die Blutversorgung der neu ausgebildeten Metastase zu gewährleisten (Kolonisation).

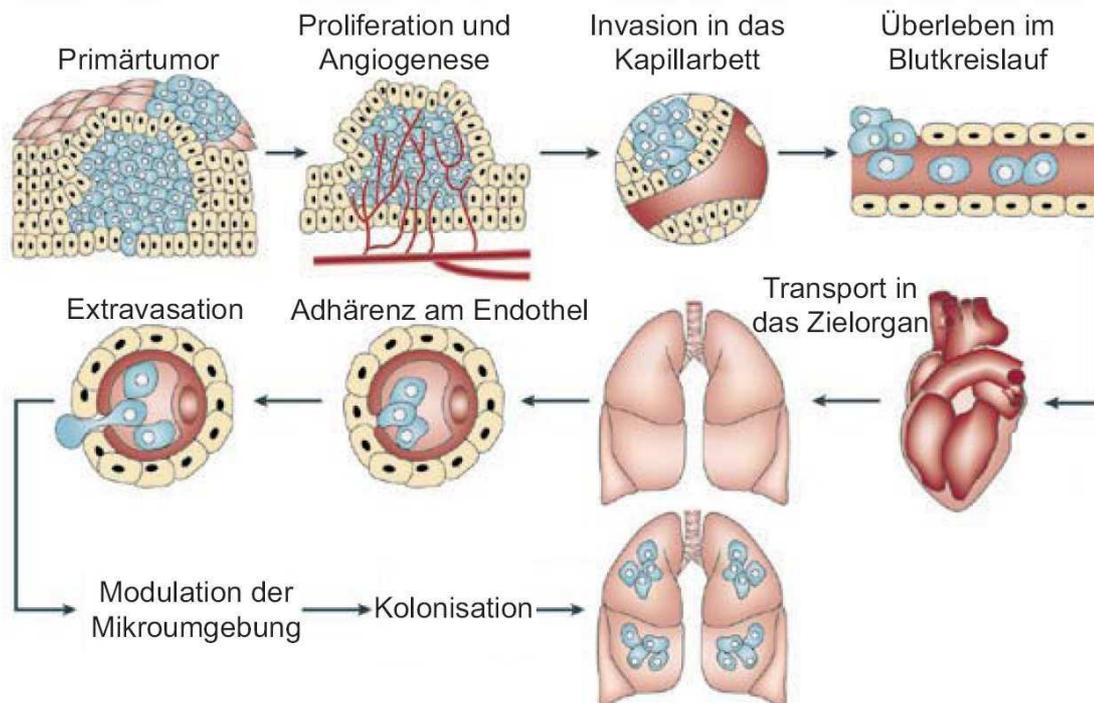


Abb. 1.5: Abfolge der metastasierungsinduzierenden Zwischenschritte. Durch Entartung einzelner Zellen entsteht durch das gestörte Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose der Primärtumor. Die notwendige Nährstoffversorgung wird durch den Anschluss an das Blutsystem gewährleistet (Angiogenese). Durch das infiltrative Wachstum des Primärtumors können die Tumorzellen die ECM abbauen und durch gerichtete Motilität in lymphatische Gefäße und Kapillaren einwandern (Invasion und Intravasation). Wenn die Tumorzellen im Blutkreislauf überleben konnten, dann müssen sie im Gefäßsystem des Zielorgans arretieren und dort das Kapillarendothel durchdringen (Extravasation). Im Zielorgan angekommen, müssen die metastatischen Tumorzellen die Mikroumgebung modulieren, proliferieren und die Neoangiogenese einleiten (Kolonisation). Modifiziert nach Fidler et al.³²

Der initiierende Schritt der Metastasierung, die Invasion, wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die einzelnen Veränderungen betreffen die Zell-Zell-Adhäsion, die Zell-Adhäsion zur extrazellulären Matrix (ECM), die proteolytische Spaltung der ECM und die Motilität der Tumorzellen, um verbleibendes Gewebe zu durchwandern. Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch Cadherine beeinflusst und die Zell-Adhäsion zur ECM durch Integrine. Die Proteolyse der ECM durch Proteinasen und aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (z.B. durch den HGF/Met-Signalweg) führt neben dem ECM-Abbau auch zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Chemokinen, welche die Motilität der Tumorzellen steuern.³³

Im Blutkreislauf angekommen, muss es den Tumorzellen dann gelingen zu überleben, bis sie ihr distantes Zielorgan erreicht haben. Die Bedingungen dafür sollten durch das körpereigene Immunsystem äußerst widrig erscheinen. Außerdem würden normalerweise gesunde Orgazellen bei Verlust der Adhäsion zu ihrer gewohnten zellulären Matrix nicht überleben. Dies konnte in vitro schon oft bewiesen werden. Diese Sonderform der Apoptose durch Verlust der Zelladhäsion wird Anoikis genannt (griech.: heimatlos). Durch den Vorgang der Anoikis gelingt es gesunden Zellen nicht, ihren eigenen Zellkomplex zu verlassen und in fremdem Gewebe zu überleben. Krebszellen schaffen es jedoch, die Anoikis zu umgehen. Schlüsselproteine der Anoikis sind derzeit Bestandteil der Forschung.³⁴

Zur Extravasation müssen die Tumorzellen im Blutkreislauf arretieren. Dies geschieht einerseits durch die Bindung von Koagulations-Faktoren und die Enge in den dünnen Kapillaren. Jedoch hauptsächlich erfolgt die Kolonisation von distantem Gewebe durch Tumorzellen gezielt organabhängig und unabhängig von den Gegebenheiten des Blutkreislaufes. Dazu sind Interaktionen der metastasierenden Tumorzelle mit der Mikroumgebung des präferierten Zielorgans notwendig. Diese organspezifischen Interaktionen wurden bereits 1889 von S. Paget in seiner „Seed and Soil“-Hypothese beschrieben. Es konnten inzwischen mehrere Peptide identifiziert werden, die selektiv an die Endothelzellen der jeweiligen Zielorgane binden (z.B. Metadherin).^{35 36} 1928 veröffentlichte J. Ewing dazu ein Gegenmodell, das die Engen im Gefäßsystem und die anatomische Verschaltung der Organe miteinander durch den Blutkreislauf als alleinige, bestimmende Faktoren für die Extravasation vorschlug. Heutzutage macht man für die metastatische Extravasation sowohl organspezifische Interaktionen entsprechend der „Seed and Soil“-Hypothese verantwortlich als auch eher unspezifische Faktoren wie die Anatomie des Gefäßsystems.

Im Zielorgan angekommen, müssen die metastatischen Tumorzellen die Mikroumgebung modulieren, proliferieren und die Neoangiogenese einleiten (Kolonisation). Die Kolonisation ist sehr ineffektiv. In In-vivo-Modellen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der metastatischen Zellen (> 80%) sowohl im Blutkreislauf überlebt als auch das Zielorgan invadieren kann, jedoch kommt es nur bei einem sehr geringen Anteil zur Ausbildung von Mikrometastasen (1:40) und zu einem noch geringeren Anteil zur Ausbildung von makroskopisch sichtbaren Metastasen (1:100).³⁷

Die Interaktion der metastatischen Tumorzelle mit der Mikroumgebung im Zielorgan nimmt also eine Schlüsselstellung in der Metastasierung ein, zu der auch die

Neoangiogenese zählt. Bisher sind mehrere Faktoren bekannt, die die Endothelzellen im Zielorgan zur Neoangiogenese stimulieren (z.B. VEGF, Eph, PDGF, TGF- β und bFGF).^{38 39 40 41 42}

Die Kolonisation der Leber spielt im Falle des kolorektalen Karzinoms eine entscheidende Rolle, denn hämatogene Metastasen sind dort in 75% der Fälle lokalisiert. Weitere Lokalisationen sind Lunge (15%), Skelettsystem (5%) und ZNS (5%).²⁷ Das Kapillarbett der Leber ist das erste, auf das die kolorektalen Krebszellen treffen. Jedoch ist die Leber nicht nur aufgrund ihrer Lage im Gefäßsystem das präferierte Organ für kolorektale Metastasen, denn in In-vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Interaktionen mit der hepatischen ECM die gezielte Metastasierung der kolorektalen Krebszellen in die Leber vermitteln, was die „Seed and Soil“-Hypothese bestätigt.^{43 44}

1.5 Diagnostisches Vorgehen und Staging

Da das kolorektale Karzinom verglichen mit anderen Krebsentitäten eine hohe Inzidenz aufweist und sich durch Entfernung seiner Vorstufen die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms verhindern lässt, bietet sich ein Screening in der Bevölkerung an. Dazu stehen verschiedene diagnostische Möglichkeiten zur Verfügung. Unterscheiden muss man dabei zwischen zwei unterschiedlichen diagnostischen Gruppen: 1) Untersuchungen des Stuhls auf occultes Blut (gFOBT = guaiac fecal occult blood test und FIT = fecal immunochemical test); 2) bildgebende Untersuchungen, die endoskopische und radiologische Verfahren einschließen (Sigmoidoskopie, Koloskopie, Doppel-Barium-Kontrast-Einlauf und virtuelle CT- und MR-Kolographie).⁴⁵

Der gFOBT ist seit 1977 zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms zugelassen und konnte seitdem in kontrollierten randomisierten Studien evaluiert werden.⁴⁶ Methodisch erfolgt durch den gFOBT der Nachweis von Häm, das im Falle eines blutenden kolorektalen Karzinoms fäkal nachgewiesen werden kann.⁴⁷ Der gFOBT konnte trotz seiner geringen Sensitivität die Mortalität des kolorektalen Karzinoms bei 45- bis 80-Jährigen um 14% reduzieren.⁴⁸ Dies liegt vor allem an der breiten Akzeptanz dieses Testverfahrens in der Bevölkerung und seiner massenweisen Anwendung. Falsch positive Ergebnisse können durch Fleisch- und Rote Beete-Verzehr, aber auch durch verschiedene Medikamente produziert werden. Zu falsch negativen Ergebnissen kommt es vor allem durch Ascorbinsäure im Stuhl. Der gFOBT soll bei Personen über

50 Jahren jährlich durchgeführt werden. Um die Detektion occulten Blutes zu verbessern, werden hierzu in der Regel drei verschiedene Stuhlproben untersucht.

Der seit 2001 zur Verfügung stehende FIT detektiert in den Stuhlproben Globin anstatt des Häms und hat eine höhere Spezifität als der gFOBT.⁴⁹

Die beiden endoskopischen Verfahren sind die Sigmoidoskopie und die Koloskopie. Die Sigmoidoskopie hat den Vorteil, dass sie kostengünstiger ist als die Koloskopie, jedoch fehlt bei dieser Methode die Einsicht proximal der linken Kolonflexur. In Deutschland wird daher die endoskopische Untersuchung mittels Koloskopie empfohlen und seit 2001 werden die Kosten für Patienten ab dem 55. Lebensjahr von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen. Als Nachteile dieses Untersuchungsverfahrens muss natürlich die Invasivität bedacht werden, jedoch liegt das Perforationsrisiko bei der vollständigen Koloskopie deutlich im Promillebereich (0,2‰).⁵⁰ Trotz der Einführung der Koloskopie in das Krebsfrüherkennungsprogramm ist die Beteiligung in der Bevölkerung äußerst gering (2%).⁵¹ Es stellt sich also die Frage, ob ein größeres Patientenkollektiv durch Screening mittels moderner bildgebender Verfahren erreicht werden könnte.

Der Doppel-Barium-Kontrast-Einlauf erzielt vor allem bei der Detektion größerer Polypen sehr gute Ergebnisse, ist aber aufgrund seiner relativ hohen Strahlendosis für den Einsatz als Screeningverfahren obsolet.^{52 53}

Die derzeit neuen virtuellen Verfahren der CT- und MR-Kolographie sind vielversprechend, denn durch die virtuelle Kolographie erfolgt ein nahezu vollständiger Einblick des Kolons bis zur Bauhin-Klappe, was bei endoskopischen Verfahren in Abhängigkeit von den anatomischen Verhältnissen und der Untersuchungsqualität nicht immer gelingt.⁵⁴ Es fehlen jedoch noch Daten aus großen randomisierten Studien, um den breiten Einsatz in der Bevölkerung zu bewerten.⁵⁵ Außerdem muss auch bei der CT-Kolographie die systemische Strahlenbelastung beachtet werden.

In den 1940er Jahren wurde das TNM-Klassifikationsschema entwickelt, das die Ausdehnung eines malignen Tumors einheitlich zuordnen sollte. Man einigte sich dabei auf die gemeinsamen Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer). Aus historischen Gründen existieren zwar auch andere Klassifikationsschemata (z.B. Dukes'-Staging), die auch noch klinisch Anwendung finden, jedoch ist es für die Evaluation von Patientendaten erforderlich, dass man sich auf ein einheitliches Staging-System beschränkt.

Das TNM-System ist mittlerweile weltweit anerkannt und wurde bereits mehrfach überarbeitet. T (Tumor) beschreibt dabei die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) das von Fernmetastasen. Durch das Hinzufügen von Zahlen (T0-4, N0-2 und M0-1) wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben. Die Angabe der TNM-Klassifikation kann entweder prätherapeutisch auf der Basis von klinischen, radiologischen oder endoskopischen Untersuchungen erfolgen oder postoperativ durch die histopathologische Aufarbeitung des entnommenen malignen Gewebes. Bisher ist die TNM-Klassifikation der zuverlässigste prognostische Marker, denn die Überlebensprognose des Patienten hängt stark von der Stadienzuteilung in der TNM-Klassifikation ab. Bei Progression der Stadienzuteilung und vor allem bei Auftreten von distanten Metastasen sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit rapide.

UICC/AJCC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIa	T1	N2a	M0
	T1/T2	N1	M0
IIIb	T1/T2	N2b	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T3/T4a	N1	M0
IIIc	T3	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1	M0
IVa	T1-T4	N1-N2	M1a
IVb	T1-T4	N1-N2	M1b

Tab. 1.2: TNM-Klassifikationssystem des kolorektalen Karzinoms definiert nach der 7. Auflage der UICC/AJCC von 2010. T1 = Tumor infiltriert die Submucosa; T2 = Tumor infiltriert die Muscularis propria; T3 = Tumor infiltriert die Serosa oder die Adventitia; T4a = Tumor perforiert das viszerale Peritoneum; T4b = Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen; N0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen; N1a = eine regionäre Lymphknotenmetastase; N1b = 2-3 regionäre Lymphknotenmetastasen; N1c = Satellitenherde in der Subserosa ohne regionäre Lymphknotenmetastasen; N2a = 4-6 regionäre Lymphknotenmetastasen; N2b = > 6 regionäre Lymphknotenmetastasen; M0 = keine distanten Metastasen; M1a = Auftreten von einer distanten Metastase; M1b = > 1 distante Metastase und/oder peritoneale Metastasen; Nach O'Connell et al.^{56 57}

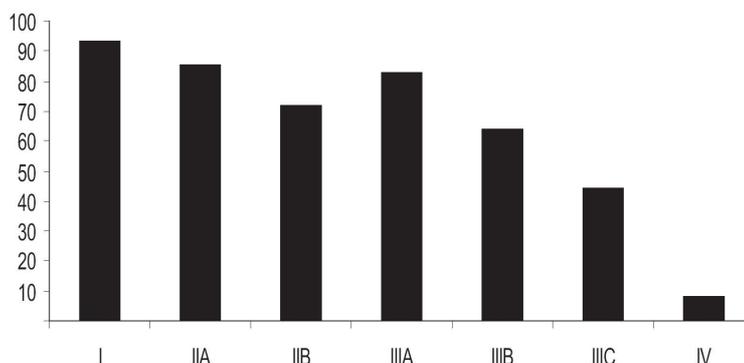
1.6 Systemische Therapie des kolorektalen Karzinoms

Bis zum Ende der 1990er Jahre stand zur systemischen Therapie des kolorektalen Karzinoms nur 5-Fluorouracil zur Verfügung. Im letzten Jahrzehnt wurden allerdings eine Reihe neuer Substanzen entdeckt. Aktuell stehen neben 5-Fluorouracil als Chemotherapeutika noch Irinotecan, Oxiplatin, Folinsäure und Capecitabin zur Verfügung. Als monoklonale Antikörper gibt es das gegen VEGF-gerichtete Bevacizumab und die gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Cetuximab und Panitumumab.⁵⁸ Dies ermöglicht vollkommen neue Kombinationsmöglichkeiten der Therapeutika und führt dazu, dass die Therapie nicht nur diagnoseabhängig erfolgt, sondern auch individuell auf den Patienten bezogen. Es birgt allerdings auch neue Herausforderungen, für jeden Patienten die wirkungsvollste Therapieoption zu finden. Durch die teuren monoklonalen Antikörper sind außerdem die Kosten einer Therapie für das Gesundheitssystem zu einer stärkeren Belastung geworden. Die Wahl einer Substanz zur systemischen Therapie bei kolorektalem Karzinom sollte daher gut durchdacht sein, damit der Patient nicht durch vermeidbare Nebenwirkungen in seiner Lebensqualität eingeschränkt und das Gesundheitssystem nicht zusätzlich belastet wird. Aus diesem Grund ist es für die Therapieplanung heute umso wichtiger, sich auf aussagekräftige Biomarker zu verlassen, um schon vor Therapiebeginn abzuschätzen, ob der Patient wirklich von der Einnahme dieses Therapeutikums profitiert. Zurzeit ist für die Therapieplanung das Onkogen K-Ras ein wichtiger Biomarker. So wurde nachgewiesen, dass nur Patienten, bei denen keine Mutation im K-Ras-Gen vorliegt, von einer Therapie mit Panitumumab oder Cetuximab profitieren. So ist die Zulassung von Panitumumab und Cetuximab mittlerweile an das Vorliegen des K-Ras-Wildtyps gekoppelt.⁵⁹

Patienten mit der Indikation für eine systemische Therapie können nach einem palliativen, einem adjuvanten oder einem neoadjuvanten Ansatz behandelt werden.⁶⁰ Der palliative Ansatz soll eine Tumorreduktion erzielen und sowohl das progressionsfreie Überleben (PFS) als auch das Gesamtüberleben (OS) steigern. Ziel einer adjuvanten Therapie ist es, nach Resektion des Primärtumors (R0) ein Rezidiv des Primärtumors und das Auftreten von Metastasen zu verhindern. Der neoadjuvante Ansatz soll die Tumormasse von potenziell resektablen Patienten so weit verringern, dass für sie eine Resektion durchführbar wird.

1.7 Verlauf und Prognose

Trotz der neuen Therapeutika und der individuellen Therapieplanungen ist die Prognose des metastasierten kolorektalen Karzinoms immer noch sehr schlecht. Haben sich erst Metastasen entwickelt (UICC/AJCC-Stadium IV), so fällt die 5-Jahres-Überlebensrate drastisch auf 8% ab.



Tab. 1.3: TNM-abhängige Prognose. Dargestellt sind die 5-Jahres-Überlebensraten in Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation in Prozentangaben. Im TNM-Stadium I liegt die 5-Jahres-Überlebensrate noch bei 93%. Im Stadium II beträgt sie noch 85-72% und im Stadium III 83-44%. Mit dem Auftreten von Fernmetastasen verschlechtert sich die Prognose jedoch rapide und so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im TNM-Stadium IV nur noch bei 8%. Nach O'Connell et al.⁵⁷

Obwohl die Einschätzung der Prognose bisher größtenteils histopathologisch mittels des TNM-Systems erfolgt, sollten Niedrig-Risiko- und Hoch-Risiko-Patienten durch den Einsatz von molekularen Markern besser differenziert werden. Dies ist vor allem für die intermediären TNM-Stadien II und III von Bedeutung. In den Stadien I und IV ist die Therapieplanung eindeutig. Ein Tumor im Stadium I wird primär chirurgisch resiziert und im Stadium IV wird durch eine systemische Therapie ein neoadjuvanter oder palliativer Ansatz verfolgt.⁶¹ Im Stadium II und III stellt sich jedoch die Frage, ob der Patient einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt werden soll. Eine Chemotherapie ist für den Patienten sehr belastend und daher sollte die Indikation kritisch erfolgen.

Wie die TNM-abhängige Prognose deutlich macht, stellt vor allem die Metastasierung für den Krankheitsverlauf das größte Risiko dar. Um Patienten zu identifizieren, die im späteren Verlauf Metastasen entwickeln werden, wurden bisher zahlreiche molekulare Marker evaluiert (z.B. HGF, Met, K-Ras, CEA, CA 19-9, p53 und LRP16).⁶² Im klinischen Alltag ist vor allem K-Ras als molekularer Marker zur Therapieplanung bei systemischer Therapie mit EGF-Rezeptor-Antikörpern akzeptiert. Die Bestimmung von CEA hat viele Störfaktoren wie Rauchen und Alkohol, allerdings wird es in der Tumornachsorge verwendet.⁶³ CA 19-9 hat eine geringere Sensitivität als CEA und wird

in der Nachsorge seltener benutzt. Seine prognostische Relevanz für das kolorektale Karzinom ist umstritten.⁶⁴ Durch andere molekulare Marker konnten in Studien teilweise auch prognostische Aussagen getroffen werden, jedoch werden sie im klinischen Alltag bei teils widersprüchlicher Studienlage selten eingesetzt. Neue effektive prognostische Marker für den klinischen Einsatz gekoppelt an bisherige Staging-Methoden wie die TNM-Klassifikation wären äußerst wichtig und zwecks der individuell abgestimmten Therapieplanung für den Patienten von großem Vorteil. Ließe sich in frühen TNM-Stadien bestimmen, ob der Tumor im Verlauf metastasieren wird oder ob das eher unwahrscheinlich ist, könnte man einerseits die Hoch-Risiko-Patienten engmaschiger kontrollieren und andererseits mit deutlicherer Indikation einer adjuvanten Chemotherapie zuführen. Gerade in den TNM-Stadien II und III stellt sich die Frage nach einer adjuvanten Chemotherapie. Derzeit ist nach den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft erst ab dem Stadium III eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Bei Patienten im Stadium II ist eine adjuvante Chemotherapie weiterhin sehr strittig. Im Stadium II kann die 5-Jahres-Überlebensrate durch eine adjuvante Chemotherapie um 2-4% zwar leicht angehoben werden, jedoch beträgt die therapieinduzierte Sterberate ungefähr 1%.⁶⁵ Patienten in den frühen Entwicklungsstadien entwickeln allerdings in 30-40% ein Rezidiv oder Metastasen.⁶⁶ Dieser Anteil an Hoch-Risiko-Patienten könnte durch die klinische Anwendung eines molekularen Markers kombiniert mit der histopathologischen TNM-Klassifikation effektiver selektiert werden und das schon in bereits sehr frühen Tumorentwicklungsstadien unabhängig vom Nodalstatus.

1.8 MACC1

Die Arbeitsgruppe Prof. Ulrike Stein (Forschungsgruppe Prof. Peter M. Schlag, Chirurgische Onkologie, Experimental and Clinical Research Center (ECRC), Charité Universitätsmedizin Berlin, am Max-Delbrück-Centrum Berlin (MDC)) identifizierte auf der Suche nach effektiveren prognostischen Markern für die Kolonkarzinom-Metastasierung das vorher unbeschriebene Gen MACC1 (Metastasis Associated in Colon Cancer 1). Es wurde mittels vergleichender Differential-Display RT-PCR Analysen von RNA aus primären Kolontumoren, deren Metastasen, normaler Kolonmucosa, sowie aus Normalgeweben der distanten Metastasierungszielorgane identifiziert und kloniert. Dabei zeigte sich bei sieben cDNA-Fragmenten eine deutliche Überexpression in den Gewebeproben von primären Kolontumoren und deren

Fernmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe. Eines von diesen cDNA-Fragmenten zeigte nach Sequenzabgleich mit bisher bekannten Genen keine Übereinstimmung. Dieses neu identifizierte Gen erhielt den vorläufigen Namen 7a5. Danach wurde der Name MACC1 beim „HUGO Gene Nomenclature Committee“ beantragt und bewilligt. Interessanterweise ist die Expression von MACC1 in den Primärtumoren erhöht, die später Metastasen entwickeln. Damit stellt MACC1 ein wichtiges prognostisches Gen dar.

Es konnte nachgewiesen werden, dass MACC1 Zellmotilität, Invasion und Proliferation *in vitro* induziert. Darüber hinaus konnte in Mäusen mittels Endpunktanalyse gezeigt werden, dass MACC1 auch *in vivo* die Metastasierung induzieren kann.

Das MACC1-Gen hat eine Länge von 2559 Basenpaaren und kodiert für ein 97kDa großes Protein (852 Aminosäuren). Die 7 Exons und 6 Introns sind auf dem Chromosom 7 (7p21.1) von 20.146.776 bis 20.223.538 des Minusstrangs lokalisiert.⁶⁷ Die Lokalisation von MACC1 auf Chromosom 7 ist sehr interessant, denn eine chromosomale Aneuploidie von Chromosom 7 im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen und anderen Krebsentitäten wurde bereits mehrfach beschrieben.^{68 69 70} Außerdem sind in der Nähe von MACC1 (GeneLoc map Region 18.146.776 – 22.223.538 bp) mehrere Gene lokalisiert, die an der Signaltransduktion und der Regulation von Zelladhäsion und -motilität beteiligt sind und von denen man weiß, dass sie beim kolorektalen Karzinom zu einem Fortschreiten des Primärtumors und zur Ausbildung von Metastasen führen (TWISTNB, TWIST1 und ITGB8).^{71 72} Darüber hinaus sind sowohl das HGF- als auch das Met-Gen auf Chromosom 7 lokalisiert (7q31.2 und 7q21.1), in deren Signalweg MACC1 eine zentrale Rolle einnimmt.

1.8.1 Putative Domänenstruktur

Die Domänenstruktur von MACC1 prädestiniert es als Signaltransduktionsmolekül, denn es besitzt eine SH3-Domäne, ein prolinreiches Motiv PXXP, eine ZU5-Domäne und zwei Death-Domänen. Im Rahmen dieses Projektes soll vor allem die Bedeutung der SH3-Domäne untersucht werden.

Über die SH3-Domäne können spezifische Proteininteraktionen vermittelt werden. Die Abkürzung SH3 steht für Src-homology 3. Erstmals wurde es in dem Protoonkogen Src beschrieben. Die Region ist 67 Aminosäuren lang und erkennt insbesondere prolinreiche Motive (PXXP).^{73 74} Die SH3-Domäne kommt in einer großen Anzahl an

intrazellulären und membrangebundenen Proteinen mit enzymatischer Aktivität oder zytoskeletaler Funktion vor.^{73 75 76}

Prolinreiche Motive (PXXP) sind weit verbreitet in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Proteomen.^{77 78} Zusammen mit ihren Bindungspartnern (Erkennungsmotiv von SH3-Domänen) übernehmen prolinreiche Motive eine unentbehrliche Rolle in der Signaltransduktion von Protein-Protein-Interaktionen.⁷⁹ In MACC1 kommt sowohl eine SH3-Domäne vor als auch ihr Erkennungsmotiv PXXP. Aufgrund dessen wird eine bidirektionale Interaktion mit potenziellen Bindungspartnern ermöglicht.

Am 5'-Ende vom MACC1-Gen ist eine ZU5-Domäne codiert. ZU5-Domänen sind beteiligt an Protein-Protein-Interaktionen. Bisher sind allerdings noch keine inter- oder intramolekularen Interaktionen der ZU5-Domäne von MACC1 bekannt.⁸⁰

Am 3'-Ende vom MACC1-Gen sind zwei Death-Domänen codiert. Viele Proteine mit Death-Domänen vermitteln angeborene Immunität, Entzündungssignale oder gerichtete Migration.⁸⁰

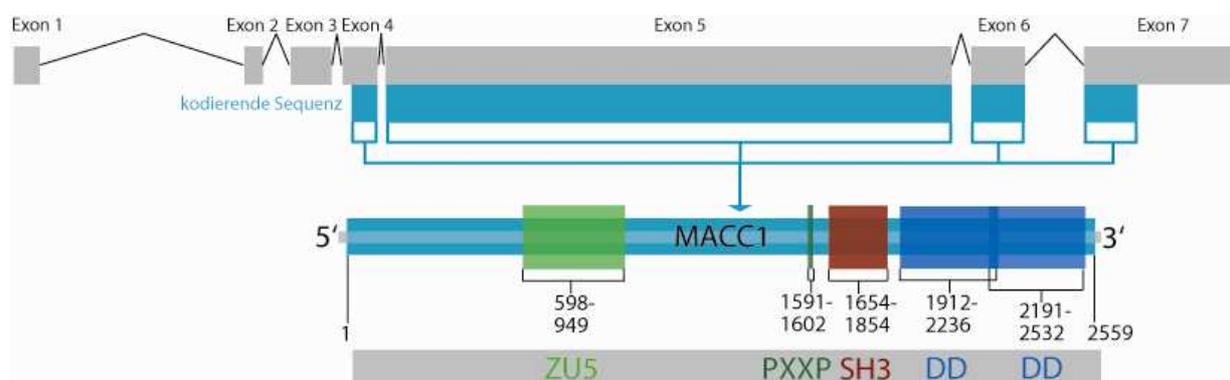


Abb. 1.5: Putative Domänenstruktur von MACC1. Das MACC1-Gen hat eine Länge von 2559 Basenpaaren. Die 7 Exons und 6 Introns sind auf dem Chromosom 7 (7p21.1) von 20.146.776 bis 20.223.538 des Minusstrangs lokalisiert. Domänenstrukturen von MACC1 sind die ZU5-Domäne, das prolinreiche Motiv (PXXP), die SH3-Domäne und zwei Death-Domänen. Nach Stein et al.⁸⁰

1.8.2 Die Rolle von MACC1 im HGF/Met-Pathway

Der Hepatocyte-Growth-Factor (HGF) ist der Ligand des Met-Rezeptors. Durch die Bindung von HGF an Met wird der HGF/Met-Signalweg aktiviert, der Proliferation, Migration, Invasion, EMT, Angiogenese und Metastasierung induziert.⁸¹ Über den Einfluss des HGF/Met-Signalweges wurde auch bei anderen Krebsentitäten berichtet, doch gerade im Falle des kolorektalen Karzinoms scheint dieser Signalweg von besonderer Bedeutung zu sein.⁸²

Die Bedeutung von MACC1 für den HGF/Met-Signalweg konnte bewiesen werden, indem man Zellen, die MACC1 exprimierten, HGF applizierte. Diese Zellen zeigten eine stark gesteigerte Proliferation und Motilität.⁸³ Zellen, die kein MACC1 exprimierten, zeigten nach HGF-Applikation keine Veränderungen.

Die Aktivierung des Rezeptors Met durch seinen Liganden HGF führt zu dessen Dimerisierung und löst eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden aus, von denen vor allem der PI3K- und der MAPK-Signalweg mit Metastasierungsparametern assoziiert sind.⁸⁴ Ein Inhibitor des PI3K-Signalweges ist Wortmannin und der MAPK-Signalweg lässt sich z.B. mittels MEK-Inhibitoren blockieren. Es stellte sich heraus, dass die MACC1-vermittelte Motilität durch Applikation von Wortmannin unverändert bleibt, bei Applikation von MEK-Inhibitoren jedoch stark abfällt. Des Weiteren wurde auch die MACC1-Expression durch MEK-Inhibitoren verringert.^{83 81} Somit scheint der MAPK-Signalweg für die Expression von MACC1 verantwortlich zu sein.⁸³

Neben seiner Steigerung der MACC1-Expression über den MAPK-Signalweg bewirkt der HGF/Met-Signalweg außerdem eine Translokation des MACC1-Proteins aus dem Zytosol in den Nucleus.⁸³ Im Nucleus interagiert MACC1 mit der Bindungsstelle von SP1, einem Transkriptionsfaktor des Met-Promotors.⁸⁵ Dadurch, dass Met stärker exprimiert wird, verstärkt sich bei ausreichendem HGF die Wirkung des HGF/Met-Signalweges. Dies erzeugt eine Schleife, die zu einer positiven Rückkopplung im HGF/Met-Signalweg führt.⁸¹

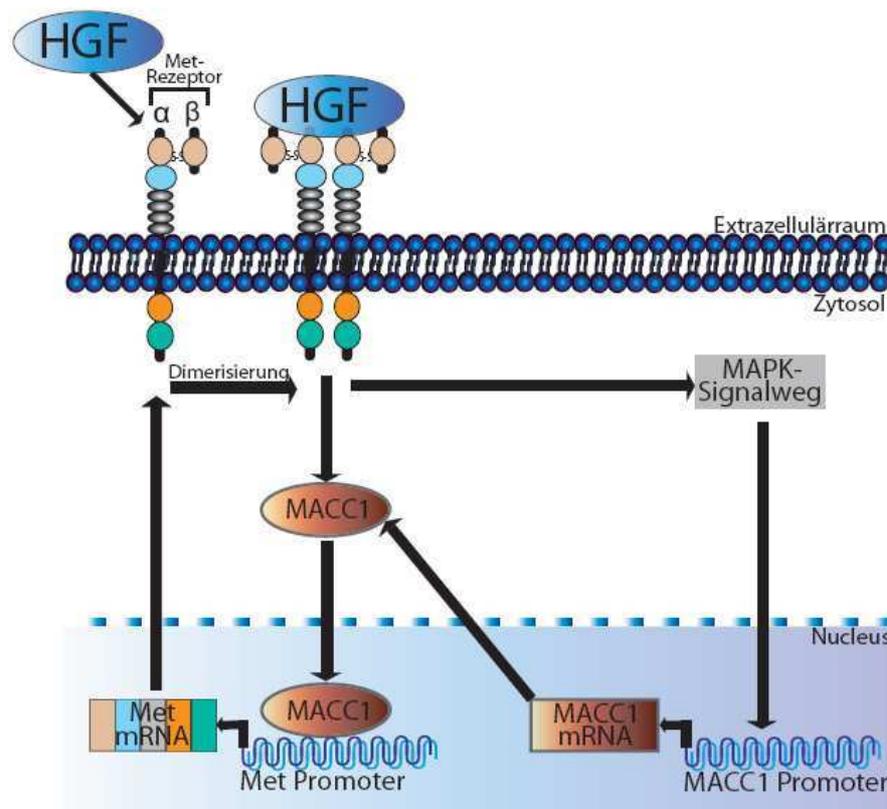


Abb. 1.7: MACC1 ist Bestandteil des HGF/Met-Signalweges. Durch Bindung von HGF an die α - und β -Kette der extrazellulären Sema-Domäne des Met-Rezeptors dimerisiert dieser. Dadurch wird zum einen der MAPK-Signalweg aktiviert und zum anderen wandert das MACC1-Protein aus dem Zytosol in den Zellkern ein.⁸¹ Der MAPK-Signalweg bewirkt nach dessen Aktivierung eine gesteigerte MACC1-Expression und das in den Zellkern gewanderte MACC1 wirkt als Transkriptionsfaktor am Met-Promotor. Dadurch wird eine positive Rückkopplung erzeugt. Nach Art und Stein, Pavolvich und Schmidt.^{81 86}

1.8.3 Metastasierungsprognose mit MACC1 als molekularem Marker

MACC1 wurde von der Arbeitsgruppe Stein bezüglich seiner prognostischen Aussagekraft evaluiert. Die durchgeführten Analysen bestätigten, dass MACC1 ein effektiver prognostischer Marker für die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms darstellt und dabei von Alter, Geschlecht, Tumortiefe, Lymphknotenstatus und Lymphgefäßinvasion unabhängig ist.⁸³ Es zeigte sich außerdem, dass das metastasefreie Überleben mit der MACC1-Expression korreliert. Dies spiegelte sich in der 5-Jahres-Überlebensrate wider. Patienten, deren Primärtumor MACC1 überexprimierte, hatten ein durchschnittliches 5-Jahres-Überleben von 15%, wohingegen Patienten mit niedriger MACC1-Expression ein 5-Jahres-Überleben von 80% aufwiesen.

Ein weiterer Grund, warum MACC1 als prognostischen Marker eine so große Bedeutung zukommt, ist, dass sich mit Hilfe von MACC1 sehr frühzeitig Aussagen hinsichtlich der Metastasierungsprognose treffen lassen. So ist es in den frühen TNM-

Stadien I-III möglich, durch die MACC1-Expression eine Aussage bezüglich der Metastasierungswahrscheinlichkeit und der Überlebensprognose zu treffen und demnach Hoch-Risiko- und Niedrig-Risiko-Patienten zu unterscheiden. Unter alleiniger Anwendung des bisherigen histopathologischen TNM-Klassifikationsschemas würde sich für einen Patienten im Stadium II eine 5-Jahres-Überlebensrate von 85-72% ergeben.⁵⁷ Dieser Wert würde allerdings stark sinken, sollte der Primärtumor dieses Patienten MACC1 überexprimieren. In diesem Fall ergäbe sich ein engmaschigeres Netz an Kontrolluntersuchungen für den Patienten und man würde therapeutisch Veränderungen durchführen. MACC1 hilft, eine Lücke in der TNM-Klassifikation gerade in den Stadien I-III zu schließen, in der bisher durch den histopathologischen Status nicht effektiv genug das individuelle Risiko des Patienten wiedergegeben werden konnte.

1.9 Zielstellung

Die Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom wird stark durch das Auftreten von Metastasen beeinflusst. Evaluierungen von molekularen Markern zum Nachweis von Metastasen in frühen Phasen haben für den klinischen Einsatz keinen klaren Vorteil bestätigt.⁸³ Unsere Arbeitsgruppe hat MACC1 als neues metastasierungsinduzierendes Gen identifiziert. MACC1 ist ein wichtiger prognostischer Marker für die Metastasierung beim kolorektalen Karzinom. Es induziert sowohl in vitro Migration, Invasion und Proliferation als auch in vivo die Metastasierung, wie durch Endpunktbestimmungen in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden konnte. MACC1 interagiert mit der Bindungsstelle vom Transkriptionsfaktor SP1 am Met-Promotor und induziert so die Met-Expression.⁸⁵ Durch den HGF/Met-Signalweg wird außerdem über den MAPK-Signalweg die Expression von MACC1 gesteigert.

Das Ziel dieser Arbeit ist durch die Generierung eines Konstruktes, das sowohl MACC1 als auch das Reportergen Luciferase in einem gemeinsamen Vektor enthält, ein geeignetes In-vivo-Modell für die MACC1-induzierte Metastasierung zu erzeugen. Dieses Mausmodell soll zukünftig dazu beitragen, Interventionsstrategien gegen die MACC1-induzierte Metastasierung exakt zu analysieren. Zusätzlich zu diesem Konstrukt sollen Kontrollkonstrukte die Bedeutung von MACC1 und seiner SH3-Domäne für die Induktion der metastasierungsrelevanten Parameter evaluieren. Dazu sind die unter 1–4 beschriebenen Schritte erforderlich:

- 1.) Es erfolgt die Klonierung des Reportergens Luciferase zusammen mit MACC1 bzw. MACC1 Δ SH3 in den pIRES-Vektor und die stabile Transfektion in die humane Kolonkarzinomzelllinie SW480.
- 2.) Es schließen sich Expressionsanalysen an, die sowohl die Expression des Reportergens Luciferase als auch von MACC1 bzw. MACC1 Δ SH3 in den erzeugten Klonen quantifizieren.
- 3.) Die Motilität als metastasierungsrelevanter Parameter wird durch Migrations- und Invasions-Assays analysiert.
- 4.) Im Anschluss an die In-vitro-Assays soll in einem Xenograft-Mausmodell mittels In-vivo-Imaging die Metastasierungsfähigkeit der erzeugten Zellklone untersucht werden und die MACC1-induzierte Metastasierung über einen konstanten Zeitraum beobachtet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Puffer

Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNA-Ladepuffer (5x)	15% Ficoll PM400, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA, 0,3% Orange G, 15% Glycerol
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein
Ficoll PM400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin® (G418)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Luciferase-Assay	Promega Corporation, Madison, USA
Luciferin	Biosynth AG, Staad, CH
Metafectene pro	Biontex Laboratories GmbH, Planegg
Milchpulver (Marvel)	Premier International Foods, Links, UK
MOPS-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Nitrozellulose Hybond™-C extra	Amersham Biosciences, Bucks, UK
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE® MES-Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Orange G	Chemapol, Prag, Tschechien
para-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PBS (steril)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, Leon-Rot
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris, 0,5 M Na ₂ EDTA, 1 M Essigsäure, pH 8
TBS-Puffer (10x)	0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5

TBST-Puffer (1x)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween®20, pH 7,5
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRizol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypan-Blau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tween®20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Verpackungsfolie Saran	Dow Chemical Company, Horgen, Schweiz
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.2 Zellkultur

Chamber Slides	Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Transwells (12 µm)	Corning Incorporated, Acton, USA
Zellkulturflaschen (T75, T25)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.3 PCR und RT-PCR

DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Applied Biosystems, Weiterstadt
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Molekulargewichts-Marker für DNA (1000 bp DNA Ladder)	Fermentas GmbH, Leon-Rot
MuLV reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Weiterstadt
NH ₄ Reaction Buffer	Invitek GmbH, Berlin
Oligonukleotide	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
PCR-Puffer II	Applied Biosystems, Weiterstadt
Random Hexamers	Applied Biosystems, Weiterstadt
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sonden	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin
ultra pure H ₂ O	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Oligonukleotidsequenzen

Primer für Klonierung	Sequenz 5'→3'
Luciferase-fwd	ATG CTA GCA CCA TGG AAG ATG CCA AAA ACA TT
Luciferase-rev	ATC TCG AGT TAC ACG GCG ATC TTG CC
MACC1-fwd	ATT GTC GAC ACC ATG CTA ATC ACT GAA AG
MACC1-rev	ATT GTC GAC TCA ATG GTG ATG GTG ATG ATG
Primer für qPCR	Sequenz 5'→3'
MACC1-fwd	TTC TTT TGA TTC CTC CGG TGA
MACC1-rev	ACT CTG ATG GGC ATG TGC TG
Sonden für qPCR	Sequenz 5'→3'
MACC1-FITC	GCA GAC TTC CTC AAG AAA TTC TGG AAG ATC TA-FITC
MACC1-LCRed640	LCRed640-AGT GTT TCA GAA CTT CTG GAC ATT TTA GAC GA

Tab. 2.1: Primer und Sonden für PCR und qPCR.

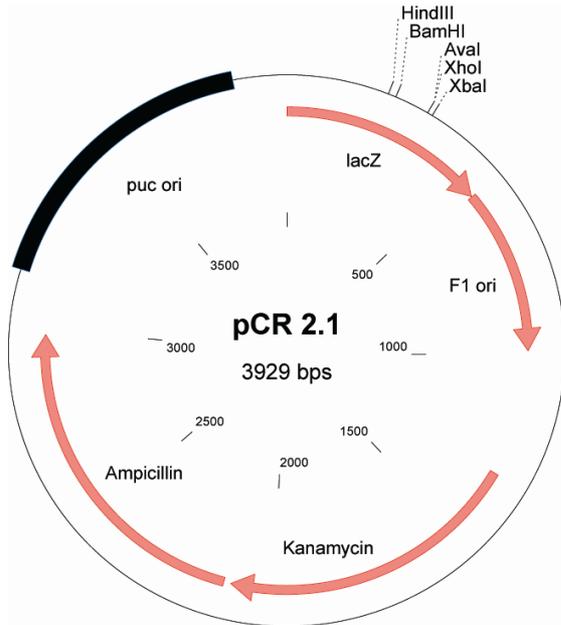
2.1.5 Kits und Enzyme

CL-XPosure™ Film	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Jet Star Plasmid Purification System	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
LightCycler®-DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche Diagnostics, Mannheim
NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pwo-Master	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4 Ligase	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
Taq DNA-Polymerase	Invitek GmbH, Berlin

2.1.6 Vektoren und Zelllinien

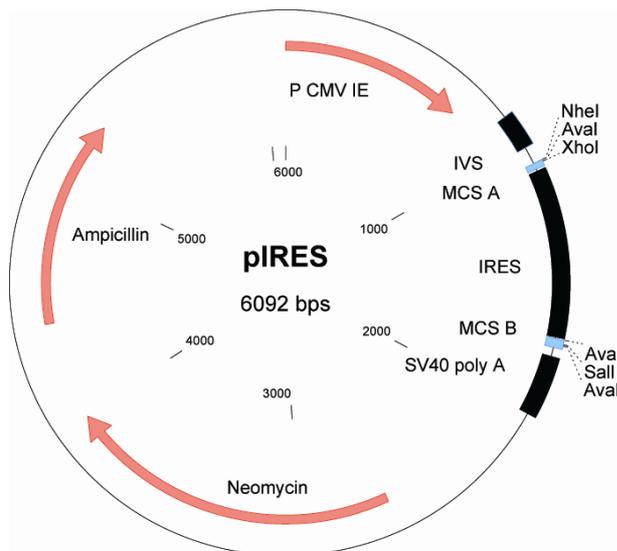
E. coli DH5α (chemisch kompetent)
 SW480
 pCR®2.1
 pIRES-Vektor

GIBCO BRL, Karlsruhe
 ATCC, Manassas, USA
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Clontech Laboratories, Mountain View, USA



LacZ gene:	1-545
M13 Reverse priming site:	205-221
T7 promotor:	362-381
M13 (-20) Forward priming site:	389-404
F1 origin:	546-983
Kanamycin resistance ORF:	1317-2111
Ampicillin resistance ORF:	2129-2989
pUC origin:	3134-3807

Abb. 2.1: pCR 2.1 Vektor. Quelle: TA Cloning® Kit User Manual (Invitrogen)



P CMV IE:	1-750
Intervening sequence (IVS):	890-1022
Multiple cloning site A:	1085-1107
IRES-sequence:	1130-1710
Multiple cloning site B:	1722-1748
SV40 poly A:	1787-2008
Neomycin expression cassette:	2622-3989
Ampicillin resistance gene:	4400-5260

Abb. 2.2: pIRES-Vektor. Quelle: pIRES-Vector User Manual (Clontech)

2.1.7 Geräte

The Belly Dancer (Probenschüttler)	Stovall Life Science Inc., Greensboro, USA
Brutschank (Bakterien)	Rudolf Hasse KG, Berlin
Countess [®] automated cell counter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer: Horizon [®] 11x14	GIBCO BRL, Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer-mini: Horizon [®] 58	GIBCO BRL, Karlsruhe
Elektrophorese Power Supply ST 606T	GIBCO BRL, Karlsruhe
Varifuge 20 RS	Heraeus Instruments/ Kendro, Asheville, USA
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Ultra low Temperature Freezer (-80°C)	Sanyo Fisher Sales, München
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
LightCycler [®] 480	Roche Diagnostics, Mannheim
NanoDrop TM 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA
NightOWL LB 981	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
SDS-PAGE-Kammer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Spectrafluor plus	Tecan Deutschland GmbH, Berlin
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Transilluminationskammer	Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf
Transferkammer Semi-Dry Transfer cell	BioRad Laboratories Inc., München
Zellinkubator (Nuair TM US Utoflow)	Zapf Instrumente, Sarstedt

2.2 Klonierung und Restriktionsenzymverdau

Für die Klonierungen wurden Restriktionsenzyme, Ligasen und Phosphatasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Ziel der Klonierung war es, ein Konstrukt zu generieren, was sowohl das Reporter-gen Luciferase als auch MACC1 in einem gemeinsamen IRES-Vektor enthält (Luciferase-IRES-MACC1). Zusätzlich wurde ein Kontrollkonstrukt generiert, was ausschließlich das Reporter-gen Luciferase enthält (Luciferase-IRES). Zur Evaluation des Einflusses der SH3-Domäne auf die MACC1-Funktion wurde außerdem ein Konstrukt mit mutiertem MACC1 (MACC1 Δ SH3) generiert, welches eine Deletion der SH3-Domäne aufweist (Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3).

Als Erstes wurde das Reporter-gen Luciferase in den IRES-Vektor kloniert, da sich Schnittstellen von Restriktionsenzymen, die für die Klonierung des Reporter-gens Luciferase notwendig sind, auch im MACC1-Gen befinden. Für die Klonierung von MACC1 in den IRES-Vektor wurde ein Übergangsvektor erzeugt (pCR2.1).

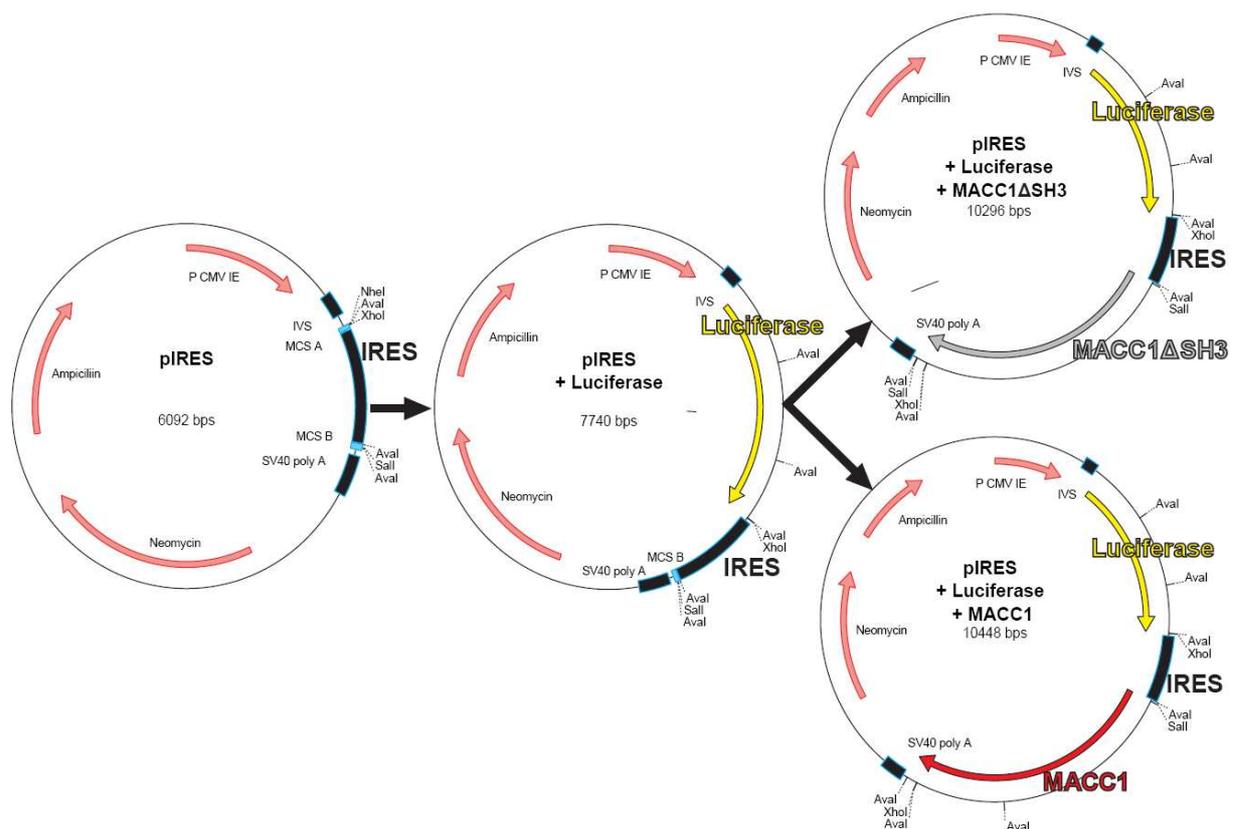


Abb. 2.3: Übersicht der Klonierung. Als Erstes wurde in den pIRES-Vektor das Reporter-gen Luciferase [gelb] in die multiple cloning site A (MCS A) kloniert. Danach wurde das mutierte MACC1 (MACC1 Δ SH3) [grau] bzw. das Wildtyp-MACC1 [rot] aus dem Übergangsvektor pCR 2.1 in die multiple cloning site B (MCS B) kloniert.

Für DNA-Gelelektrophoresen wurden 1%ige Agarosegele (Electrophoresis Grade Agarose, Invitrogen, Karlsruhe) in TAE-Puffer hergestellt und Horizon[®] Kammern (Biometra GmbH, Göttingen) verwendet. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel diente der Invisorb Spin DNA Extraction Kit[®] der Invitex GmbH (Berlin). Bei der Transformation wurden chemisch kompetente Zellen des Escherichia-coli-Stammes DH5 α nach Herstellerprotokoll benutzt (Subcloning Efficiency[™] DH5 α [™] Chemically Competent Cells, Invitrogen). Analytische Plasmidpräparationen wurden mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitex GmbH, Berlin) durchgeführt und quantitative Präparationen mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kontrollrestriktionsenzymverdau und Sequenzierung verifiziert (Invitex GmbH). Sequenzanalysen und Oligonukleotid-Designs wurden mit dem Programm Clone Manager 6 durchgeführt.

PCRs mit Taq-Polymerase (Invitex GmbH) wurden auf dem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für Amplifikationen mit Proofreading-Polymerase wurde der Pwo Master Kit von Roche nach Herstellerprotokoll verwendet (Roche Applied Science, Mannheim). Alle Primer wurden von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert und HPLC gereinigt.

2.3 Stabile Transfektion

Für die Transfektion der erzeugten Konstrukte wurde die Kolonkarzinomzelllinie SW480 ausgewählt. SW480 Zellen stammen aus dem Primärtumor eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. Der Primärtumor hatte zum Zeitpunkt der Zellentnahme weder Lymphknotenmetastasen noch Fernmetastasen ausgebildet und befand sich im Stadium T3-T4.⁸⁷ SW480 Zellen exprimieren intrinsisch kein MACC1 und eignen sich daher im Rahmen dieses Projektes zur Evaluation der erzeugten Vektoren.⁸⁸

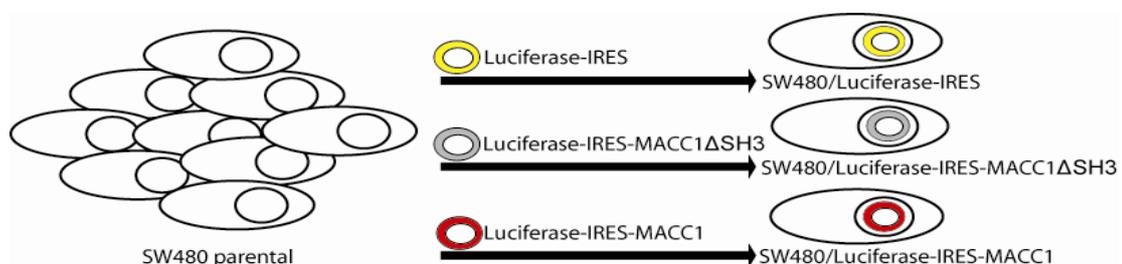


Abb. 2.4: Übersicht der transfizierten Konstrukte. Ausgehend von der parentalen Zelllinie SW480, die intrinsisch kein MACC1 exprimiert, wurden Klone mit allen drei Konstrukten erzeugt. Ein Klon enthält das Kontrollkonstrukt mit dem Reportergen Luciferase im IRES-Vektor (Luciferase-IRES [gelb]). Die beiden anderen Klone enthalten das Reportergen Luciferase im IRES-Vektor gemeinsam mit mutiertem MACC1 (Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 [grau]) bzw. mit MACC1 vom Wildtyp (Luciferase-IRES-MACC1 [rot]). Nach Kelch.⁸⁹

Am Tag 1 der Transfektion wurden in eine 10-cm-Schale 1×10^6 Zellen eingesät, gelöst in 10 ml Medium (RPMI + 10% FKS). Am zweiten Tag waren mehr als 50% der Zellen konfluent und es wurden Ansätze mit 10 µg der Plasmid-DNA und Metafectene pro nach Herstellerprotokoll auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel (RPMI + 10% FKS) durchgeführt und dem neuen Medium G418 (5 µg/ml) hinzugefügt. G418 (Geneticin) ist eine Substanz aus der Gruppe der Aminoglycoside. Es hemmt die Proteinbiosynthese über Inhibition der großen ribosomalen Untereinheit.⁹⁰ Durch G418 wurden die Zellen, die keine G418-Resistenz exprimierten, im Wachstum stark inhibiert. Zellen, die jedoch eines der generierten IRES-Konstrukte enthielten, wurden durch die im IRES-Vektor enthaltene G418-Resistenz geschützt. Ein Mediumwechsel und die Zugabe von G418 erfolgten dreimal wöchentlich, bis sich auf den Platten inselartige Zellkolonien bildeten, die scharf umrandet waren. Die Kolonien, die sich nach ca. 2 Wochen ausgebildet hatten, wurden unter Verwendung von sterilen Metallzylindern gepickt und in Kulturschalen vermehrt, deren Größe sich entsprechend angepasst an das Zellwachstum über die Zeit vergrößerte (48-, 24-, 12-, 6-Well, T25- und T75-Flaschen). Während der Kultivierung der stabil transfizierten Klone erhielten die Zellen weiterhin dreimal wöchentlich FKS-haltiges Medium mit gleichbleibender Konzentration an G418, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, und wurden bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Die parentale Zelllinie SW480 erhielt dieselben Kultivierungsbedingungen, jedoch enthielt das Medium kein G418. Nachdem von den Zellen stabile Klone erzeugt wurden, konnten Zellpellets mit Klonen aller drei Konstrukte in 1 ml Einfriermedium (FKS + 10% steriles DMSO) bei -80°C gelagert werden.

2.4 Luciferaseaktivitäts-Assay

Der Luciferaseaktivitäts-Assay beruht auf der Messung der Lumineszenz, die durch das Enzym Luciferase unter Anwesenheit des Substrates Luciferin katalysiert wird. Die Expressionsrate der Luciferase und die erzeugte Lumineszenz korrelieren miteinander.

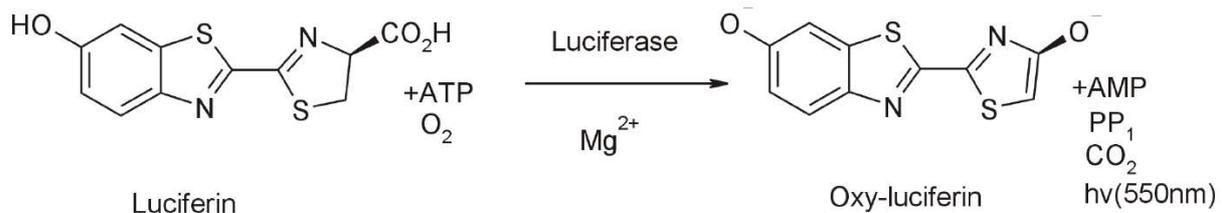


Abbildung 2.5: Durch Luciferase katalysierte Decarboxylierungsreaktion. Die Lichtemission, die bei 562 nm gemessen wird, hängt von der Konzentration des Luciferaseenzym ab, nachdem das Substrat Luciferin im Überschuss hinzugegeben wurde. Das Luciferase-Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin in Gegenwart von ATP, Sauerstoff und Mg-Ionen. Dies ermöglicht die quantitative Bestimmung des Expressionslevels vom Reportergen. Nach Jakupović.⁹¹

Für den Luciferaseaktivitäts-Assay wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in FKS-haltigem RPMI-Medium gelöst. Mit dem Countess[®] automated cell counter (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden die im Medium gelösten Zellen gezählt. 2×10^4 Zellen wurden pro Well in eine 96-Well-Platte mit insgesamt 50 μl FKS-haltigem RPMI-Medium überführt und 50 μl der Luciferase-Assay-Reagenz (Promega Corporation, USA) hinzugegeben. Das Luciferase-Assay-Reagenz wurde zuvor auf Raumtemperatur (RT) gebracht und gevortext. Zellhaltiges Medium und Luciferase-Assay-Reagenz wurden durch Pipettieren vorsichtig gemischt und danach wurde der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert, bevor mittels Spectrafluor plus (Tecan Deutschland GmbH, Berlin) die Messung der Lumineszenz erfolgte.

2.5 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der RNA-Proben wurde TRIzol (Invitrogen) benutzt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in FKS-haltigem Medium resuspendiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation und zu dem so gewonnenen Zellpellet wurde 1 ml TRIzol hinzugefügt. Die Mischung wurde so lange pipettiert, bis sie homogen war und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Phasenauftrennung wurde Chloroform dazugegeben und nach dem Zentrifugationsschritt die obere RNA-haltige Phase zur weiterführenden Präzipitation entnommen. Nach der Präzipitation wurde das getrocknete Pellet in 80 μl ddH₂O resuspendiert. Die RNA-Proben wurden daraufhin mittels NanoDrop auf ihre RNA-Konzentration überprüft und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6 Quantitative real-time RT-PCR

Zur Expressionsanalyse der Klone wurde das Verfahren der quantitativen real-time RT-PCR angewandt. Dazu wurde mit den RNA-Proben zunächst eine Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) durchgeführt. In die Reverse-Transkriptase PCR wurden 50 ng RNA der Proben eingesetzt und im Thermocycler T3000 nach folgendem Programm verfahren: 15 min 42°C, 5 min 99°C, 5 min 5°C, ∞ 4°C. 2 µl der revers transkribierten Proben wurden dann in die quantitative real-time PCR eingesetzt.

Die quantitative real-time RT-PCR basiert auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren nach dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die quantitative real-time RT-PCR ermöglicht, die PCR in Echtzeit zu verfolgen und die amplifizierten Gensequenzen zu quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgt hier durch Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus. Zur Messung der Fluoreszenz gibt es verschiedene Methoden, wobei in dieser Arbeit Hybridisierungssonden zum Einsatz kamen. Bei den Hybridisierungssonden handelt es sich um zwei genspezifische Sonden, die durch fluoreszierende Farbstoffe unterschiedlicher Anregungs- und Emissionsspektren eine Quantifizierung ermöglichen. Die Bindungsstellen der beiden Hybridisierungssonden liegen auf der Zielsequenz nebeneinander. Eine der Sonden trägt am 3'-Ende einen Akzeptor und die andere an ihrem 5'-Ende einen Donor. Hybridisieren die beiden Sonden nun mit der Sequenz des Zielgens, liegen die Farbstoffe der Donor- (FITC) und der Akzeptor-Sonde (LC-Red 640) direkt nebeneinander. Der Donor nimmt nun Licht seines spezifischen Anregungsspektrums (A1) auf und gibt die Energie in seinem spezifischen Emissionsspektrum (E1) ab. Dadurch, dass sich das Anregungsspektrum der Akzeptor-Sonde und das Emissionsspektrum der Donor-Sonde überschneiden ($E1=A2$), wird nun die Akzeptor-Sonde durch die räumliche Nähe zur Donor-Sonde angeregt (im Falle, dass beide Sonden mit dem Zielgen hybridisiert sind) und gibt die Energie in ihrem spezifischen Emissionsspektrum ab (E2). Die Energieübertragung von der Donor-Sonde auf die Akzeptor-Sonde wird FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) genannt. Die Quantifizierung in diesem Verfahren erfolgt allerdings nicht durch Messung der FRET, da es sich dabei um einen strahlungslosen Energietransfer handelt, sondern durch Messung des Emissionsspektrums der Akzeptor-Sonde (E2).⁹² Das Design der MACC1-spezifischen Sonden und Primer (siehe 2.1.4) erfolgte in der Arbeitsgruppe Stein (ECRC, Charité Universitätsmedizin Berlin, MDC Berlin-Buch).

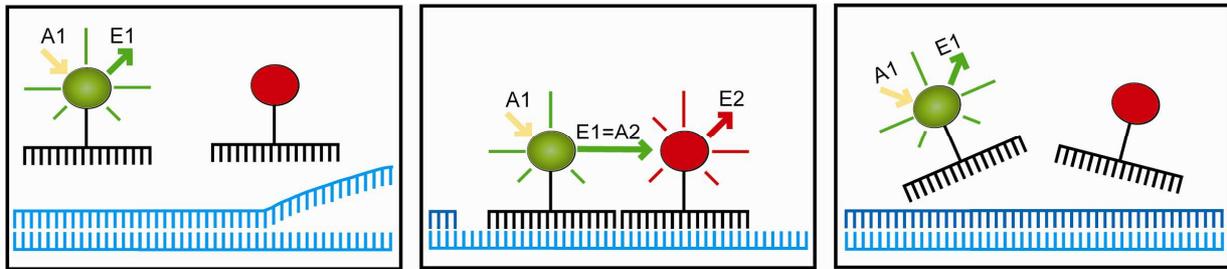


Abb. 2.6: Prinzip der quantitativen real-time RT-PCR mit Hybridisierungssonden. Donor-Sonde (grün) und Akzeptor-Sonde (rot) kommen sich durch Bindung an deren Zielsequenz während des PCR-Zyklus räumlich näher. Durch die räumliche Nähe kann die Donor-Sonde die Energie des absorbierten Lichtes (A1) an die Akzeptor-Sonde übertragen (FRET), da sich Emissionsspektrum der Donor-Sonde und Absorptionsspektrum der Akzeptor-Sonde überschneiden (E1=A2). Das Emissionsspektrum der Akzeptor-Sonde (E2) wird dann zur Quantifizierung gemessen. Nach Holzapfel et al., Kelch.^{92 89}

Für die quantitative real-time RT-PCR wurden für jede RT-Probe zwei parallele Ansätze zur Ermittlung der Expression von MACC1 und des verwendeten Referenz-Gens Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) analysiert. Die Generierung der Standardkurve für die absolute Quantifizierung der MACC1-Expression erfolgte durch definierte Verdünnungsreihen revers transkribierter RNA eines MACC1-exprimierenden Plasmids in unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen (1,2 ng – 75 ng). Die Generierung der Standardkurve für das Referenz-Gen G6PDH erfolgte durch die Verwendung einer definierten Verdünnungsreihe von revers transkribierter RNA aus der Zelllinie HCT116 (Ausgangskonzentrationen von 1,95 ng – 125 ng). Allen Proben wurde der LightCycler® DNA Master HybProbe Kit von Roche nach Herstellerprotokoll hinzugefügt. Das Programm für die quantitative real-time PCR erfolgte im LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) nach Herstellerprotokoll [5 min 95°C, 45x (10 sec 95°C, 30 sec 60°C, 1 sec 72°C), Schmelzkurve 40→95°C mit 2,2°C/sec].

Alle Werte wurden auf die Expression des Referenz-Gens G6PDH (LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set, Roche) und die Expression des 50-ng-Wertes der Standardkurven normalisiert. Die relativen Expressionswerte von MACC1 ergeben sich nach folgender Berechnung:

$$\text{Relative Expression von MACC1} = \frac{\frac{\text{Mittelwert}_{\text{MACC1}}}{\text{Mittelwert}_{\text{G6PDH}}}}{\frac{\text{Standardwert } 50 \text{ ng}_{\text{MACC1}}}{\text{Standardwert } 50 \text{ ng}_{\text{G6PDH}}}}$$

2.7 Western Blot

MACC1 wird in den erzeugten Klonen als V5-Fusionsprotein exprimiert. Durch einen Tag-spezifischen Antikörper kann hierdurch das MACC1-Protein mittels Western Blot nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle diente das zytoskeletale Protein β -Tubulin. Zur Proteingewinnung wurden die PBS-gereinigten Zellpellets mit 500 μ l RIPA-Puffer lysiert, 10 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinmessung des Überstandes erfolgte nach Bradford (Coomassie Plus, Pierce-Perbio, Bonn). Dazu wurden die Proteinmischungen 1:10 mit PBS verdünnt und davon 15 μ l mit 300 μ l Coomassie vermischt. Eine Verdünnungsreihe (0,025 – 2,0 μ g/ μ l) wurde ebenfalls mit Coomassie vermischt. 50 μ g der Proteinmischung sowie der Proteinmarker Rainbow Marker (Amersham Biosciences-GE Healthcare, München) wurden mit NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (1:4 verdünnt, inklusive DTT 1:10 verdünnt) versetzt und die Proteinmischungen für 10 min bei 95°C denaturiert. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteinproben und der Proteinmarker auf ein NuPAGE[®] 10% Bis-Tris Gel geladen und in der SDS-PAGE-Kammer Novex Mini cell (Invitrogen) unter Verwendung von NuPAGE[®] MES-Laufpuffer für 60 min bei 200 V aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese erfolgte das Blotting mittels Semidry-Verfahren. Hierbei wurden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran HybondTM-C extra (Amersham Biosciences) durch Elektroblothing mit der Semi-Dry Transfer Cell (BioRad Laboratories Inc.) bei 20 V für 60 min transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und bei 72 kDa (orange angefärbtes Referenzprotein) zerschnitten. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden beide Teile der Nitrozellulosemembran 60 min bei Raumtemperatur in einer Blockierlösung (5% Milchpulver, 1% BSA, 20 ml TBST) inkubiert und mit TBST gespült. Die beiden Membranteile wurden dann in zwei Boxen mit dem β -Tubulin- bzw. MACC1-Antikörper (1:1.000fache Verdünnung in TBST mit 5% BSA) gelegt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das Membranteil mit den 91 bzw. 97 kDa großen Proteinbanden diente dem MACC1-Nachweis. Der Größenunterschied von 6 kDa beruhte auf der Deletion der SH3-Domäne bei dem mutierten MACC1. Über das Membranteil mit der 50 kDa großen Proteinbande erfolgte der β -Tubulin-Nachweis (zur Übersicht der primären Antikörper siehe Tab. 2.2). Zur Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.3) wurden die Membranteile dreimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen und danach mit dem jeweiligen sekundären, Peroxidase-

gekoppelten Antikörper (1:10.000fache Verdünnung in TBST mit 5% BSA) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranteile wurden danach nochmals mit TBST gewaschen und es folgte die Inkubation mit der ECL-Lösung für 2 min. Die ECL-Lösung und die an die sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase setzten im Zuge ihrer Reaktion Elektrochemilumineszenz frei, wodurch die Proteine detektiert werden konnten. Nach der Reaktion mit der ECL-Lösung erfolgte die Exposition der Membranteile auf einem CL-XPosure™ Film (Thermo Fischer Scientific), wobei die Expositionszeiten je nach Signalstärke zwischen 5 sec und 3 min variierten.

Verwendete Lösungen:

- RIPA-Puffer 50 mM Tris pH 7,5 + 150 mM NaCl + 1% Nonidet P-40 (pro 10 ml Lysepuffer 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim))
- TBST 50 mM Tris-HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl + 0,05% Tween 20
- Transferpuffer 25 mM Tris-HCl pH 7,5 + 200 mM Glycin + 0,1% SDS + 20% Methanol
- Blockpuffer TBST + 5% Magermilchpulver + 1% BSA
- Lösung A: 0,025% Luminol in 0,1 M TrisHCL
- Lösung B: 0,11% para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
- ECL-Lösung: 4 ml Lösung A + 1,2 µl H₂O₂ + 400 µl Lösung B

Zielprotein		
β-Tubulin	Purified Mouse Anti-β-Tubulin	DB Biosciences Pharmingen, Heidelberg
MACC1	Purified Rabbit Anti MACC1	Eurogentec S.A., Seraing, Belgien; Affinitätsreinigung des Serums durch Biogenes GmbH, Berlin

Tab. 2.2: Übersicht der primären Antikörper.

Zielprotein		
β-Tubulin	Anti-Mouse IgM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MACC1	Anti-Rabbit IgG HRP	Promega GmbH, Mannheim

Tab. 2.3: Übersicht der sekundären Antikörper.

2.8 Migrations-Assay

Die Migration ist definiert als die aktive und zielgerichtete Fortbewegung einer einzelnen oder mehrerer Zellen. Für diesen Vorgang müssen sowohl die Adhäsion der Zelle beeinflusst als auch das Zytoskelett reorganisiert werden. Diese aktive Zellbewegung ist ein Merkmal von Krebszellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Metastasen.⁹³ Sie kann durch den Transwell-Filter-Assay nach Boyden unter Verwendung von Boyden Chambers (Transwells) untersucht werden. Der Boden der Boyden Chambers besteht aus einer Polykarbonatmembran, die durch 12 µm große Poren (Corning) durchlässig ist. Zellen können durch Verformung aktiv durch diese Membranporen migrieren und gelangen so in das Well, in das die Boyden Chamber eingesetzt wurde (24-Well-Platte, DB Biosciences, Heidelberg).

Zur Durchführung des Migrations-Assays nach Boyden wurden pro Klon in drei zuvor äquilibrierte Boyden Chambers je $2,5 \times 10^5$ Zellen gelöst in 400 µl FKS-haltigem Medium gegeben. In das Well, was das Transwell umgibt, wurde 1 ml FKS-haltiges Medium pipettiert. Es folgte die Inkubation der zellhaltigen Transwells für 24 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach Ablauf der 24 h wurden die Transwells vorsichtig den Wells entnommen und die am Boden des Wells haftenden Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert (50 µl Trypsin pro Well und 50 µl FKS-haltiges RPMI-Medium zum Trypsinstopp). Unter Verwendung von Neubauer Zählkammern erfolgte die Auszählung der trypsinierten Zellen. Die Zählung wurde für jedes Transwell viermal durchgeführt und aus den vier Werten der Mittelwert mit den Standardabweichungen ermittelt.

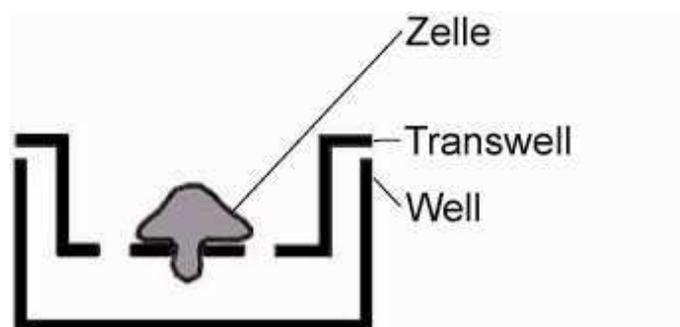


Abb. 2.7: Schematische Darstellung eines Migrations-Assays. Nach Entschladen et al., Kelch.^{93 89}

2.9 Invasions-Assay

Einer der Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren ist die Fähigkeit von malignen Tumorzellen, die Basalmembran zu durchbrechen und in das umgebende Gewebe einzuwandern (Invasion). Dadurch erhalten die Tumorzellen Anschluss an das Lymph- und Blutgefäßsystem und können in distanten Organen Metastasen ausbilden. Auf Grundlage des Matrigel Invasions-Assays kann die Invasivität von Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden wie beim Migrations-Assay Boyden-Chambers (Transwells) mit einer Porengröße von 12 µm in eine 24-Well-Platte eingesetzt. Die Membran der Boyden Chambers wurde mit je 70 µl Matrigel-Gemisch (Matrigel 1:3 verdünnt mit serumfreiem Medium) bedeckt. Die Platte mit den Matrigel-haltigen Boyden Chambers wurde für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis das Matrigel polymerisiert war. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in serumfreiem Medium aufgenommen. Pro Zellklon wurden dann in drei Transwells jeweils 5 x 10⁵ Zellen gelöst in 400 µl serumfreiem Medium hineinpipettiert. In das Well, was das Transwell umgibt, wurde 1 ml FKS-haltiges RPMI-Medium gegeben. Dadurch, dass sich die Zellen im Transwell in serumfreiem Medium befanden, sollte ein Anreiz für die Zellen geschaffen werden, um das Matrigel zu durchbrechen und so durch die Poren des Transwells in das serumhaltige Medium zu gelangen. Die Inkubationszeit der zellhaltigen Transwells betrug 72 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Transwells vorsichtig den Wells entnommen und die am Boden des Wells haftenden Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert (50 µl Trypsin pro Well und 50 µl FKS-haltiges RPMI-Medium zum Trypsinstopp). Die Zählung der Zellen erfolgte wie bei dem Migrations-Assay unter Verwendung von Neubauer-Zählkammern und wurde pro Transwell zur Ermittlung des Mittelwerts und der Standardabweichungen viermal durchgeführt.

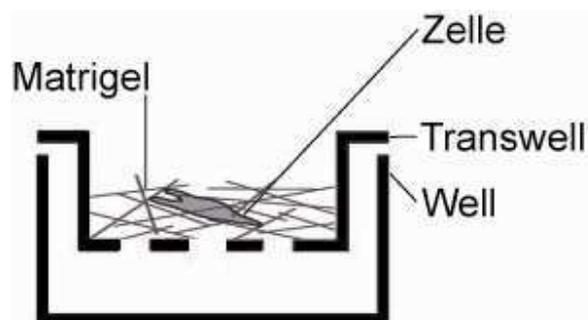


Abb. 2.8: Schematische Darstellung eines Invasions-Assays. Nach Entschladen et al.⁹³

2.10 In-vivo-Biolumineszenz-Imaging

2.10.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter der Antragsnummer 0199/09 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Es wurden 5 – 6 Wochen alte Fox Chase SCID beige Mäuse (Harlan) verwendet, die in Gruppen von 2 – 4 Tieren gehalten wurden. 5 – 7 Tage nach der Lieferung erfolgte bei einem Tiergewicht zwischen 15 und 19 g die intrasplenale Injektion der stabil transfizierten Tumorzellen. Die intraperitoneale Narkose der Tiere wurde durch eine Dreierkombination bestehend aus Ketamin 100 mg/kg, Xylazin 20 mg/kg und Acepromazin 3 mg/kg durchgeführt. Die Tiere wurden 2 – 3mal wöchentlich begutachtet und ihr Zustand durch ein Score-Sheet bewertet (siehe Tab. 2.4). Die Tötung der Tiere erfolgte 35 Tage nach intrasplener Injektion bzw. bei Erreichen eines Punktwertes ab drei nach dem verwendeten Score-Sheet.

Klinisches Zeichen:	Punktwert:
Ungewöhnliche Zunahme des Körpergewichtes	1
Abnahme des Körpergewichtes von > 10%	2
Abnahme des Körpergewichtes von > 15%	3
Stehende Hautfalten	1
Ständiger Nasen-/ Augenausfluss	1
Tier isoliert sich	1
Hautveränderungen	1
Diarrhö	2
Apathie	2
Palpable Schwellungen (vor allem abdominal)	2
Reaktionslosigkeit bei Berührung (Beurteilung während der Tierentnahme aus dem Käfig vor der Narkotisierung)	2
Verletzungen, die nicht auf operative Eingriffe zurückzuführen sind oder nicht ausheilen	2
Dyspnoe	3
Aszites	3

Tab. 2.4: Score-Sheet. Mit Hilfe des Score-Sheets wurden die Versuchstiere am Tag der Messung begutachtet. Klinische Zeichen sind mit den Punktwerten 1-3 versehen. Bei einer Gesamtpunktzahl von 2 wurde die Versuchsreihe bei dem betroffenen Tier unterbrochen. Bei einer Gesamtpunktzahl ab 3 wurde die Versuchsreihe bei dem betroffenen Tier sofort eingestellt und bei keiner Verbesserung des Zustandes das Tier nach kurzer Zeit getötet.

2.10.2 Intrasplenale Injektion

Die Versuchstiere wurden mit einer Dreierkombination bestehend aus Ketamin 100 mg/kg, Xylazin 20 mg/kg und Acepromazin 3 mg/kg intraperitoneal narkotisiert. Danach wurde ein ca. 1 cm großer Schnitt parietal zur Milz gesetzt. Es folgte die Freilegung der Milz und in einem Volumen von 50 μ l sterilem PBS wurden 3×10^6 stabil transfizierte Tumorzellen intrasplenal injiziert. Bei den stabil transfizierten Tumorzellen handelte es sich um die Zelllinie SW480, die pro Klon je eines der drei generierten Konstrukte exprimierte (Luciferase-IRES, Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 oder Luciferase-IRES-MACC1). Das durchtrennte Peritoneum wurde anschließend vernäht und die Haut geklammert. Die Klammern wurden bei ausreichender Wundheilung (nach ca. 10 Tagen) entfernt.

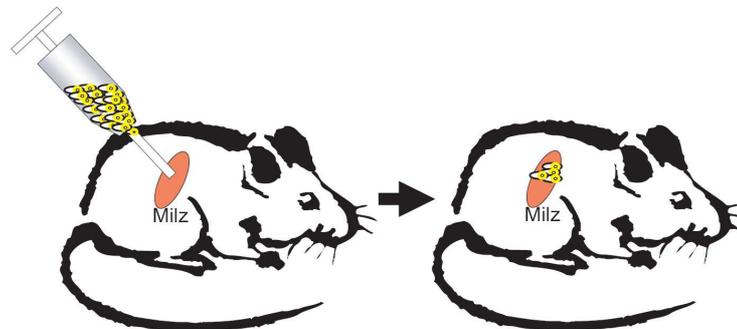


Abb. 2.9: Prinzip der intrasplenalen Injektion. Unter Narkose wurde die Milz der Tiere freigelegt und über eine Kanüle in PBS gelöste Zellen (3×10^6 Zellen / 50 μ l PBS) des jeweiligen Klons intrasplenal appliziert.

2.10.3 Biolumineszenz-Messung

In-vivo-Imaging im Allgemeinen erlaubt einen non-invasiven Einblick in einen lebenden Organismus und hilft dadurch krankheitsbedingte Veränderungen zu beobachten. Dies geschieht z.B. auf Grundlage der Biolumineszenz. Biolumineszenz ist eine Reaktion, bei der das Enzym Luciferase sein Substrat Luciferin unter Beteiligung von Cofaktoren umsetzt. Bei dieser Reaktion wird Lumineszenz emittiert, die gemessen werden kann.

Wie oben beschrieben, wurden den Versuchstieren Kolonkarzinomzellen intrasplenal injiziert, die je nach Versuchsgruppe eines der drei generierten Konstrukte exprimierten, welche als Reportergen die firefly-Luciferase enthielten.

Sechs bzw. sieben Tage nach der intrasplenalen Injektion begann das Biolumineszenz-Imaging unter Verwendung eines NightOWL LB 981 Systems (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad). Durch das NightOwl-Lichtdetektionssystem werden Photonen, die vom Untersuchungsobjekt ausgestrahlt werden, durch eine hochsensitive

CCD (charge-coupled device)-Kamera eingefangen und in elektronische Signale umgewandelt. Die gemessenen Signale erscheinen je nach Intensität in unterschiedlichen Farben und werden mit einem digitalen Foto des Untersuchungsobjektes mit Hilfe der WinLight-Software überlagert.⁹⁴

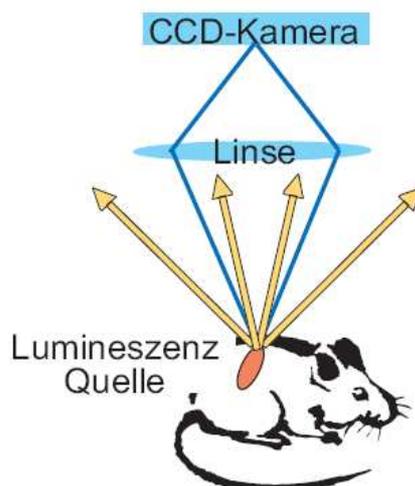


Abb. 2.10: Schematischer Aufbau der CCD-Kamera. Das Versuchstier wird unter der Kamera positioniert, wobei die Kamerahöhe variiert werden kann, um das Bild scharf zu stellen. Die durch die Lumineszenzquelle erzeugte, gestreute Photonenstrahlung wird durch eine Linse gebündelt und von der dahinter geschalteten CCD-Kamera detektiert.

Die Versuchstiere wurden vor den Messungen narkotisiert (Ketamin 100 mg/kg, Xylazin 20 mg/kg und Acepromazin 3 mg/kg) und anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion von 150 µl Luciferin. Die Messung wurde 20 min nach der Luciferininjektion gestartet und Aufnahmen bei Expositionszeiten zwischen 1 sec und 5 min angefertigt. Am letzten Tag des In-vivo-Imagings wurden den Versuchstieren nach zervikaler Dislokation Milz und Leber entnommen und von diesen ebenfalls Biolumineszenz-Aufnahmen angefertigt, nachdem die Organe mit Luciferin beträufelt wurden.

2.11 Statistische Analysen

Die Bestimmung der Signifikanzniveaus erfolgte durch Berechnung der p-Werte mit dem Programm GraphPad Prism version 4.01. Um die Kontrollgruppe im Vergleich zu den stabil transfizierten Klonen zu analysieren, wurde ein One-way-Test (ANOVA) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde für die Analysen als statistisch signifikant definiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der pIRES-Konstrukte

Grundlage der nachfolgend aufgeführten Ergebnisse und wesentlicher Bestandteil dieser Dissertation war die erfolgreiche Klonierung der pIRES-Konstrukte. Zur Überprüfung des Erfolges der Klonierung wurden Kontrollspaltungen und Sequenzierungen aller drei pIRES-Konstrukte durchgeführt.

Für die Kontrollspaltungen wurde als Restriktionsenzym Aval (Fermentas GmbH, Leon-Rot) benutzt, da die generierten Konstrukte gleich mehrmals die Aval-Erkennungssequenz aufweisen, die sowohl im Reporter-gen Luciferase und in der IRES-Site als auch in der SH3-Domäne des MACC1-Gens vorkommt.

Die Sequenzierungen wurden durch die Invitek GmbH durchgeführt und mit dem Programm Clone Manager 6 ausgewertet. Der sequenzierte Bereich der Konstrukte beinhaltete sowohl das Reporter-gen Luciferase und die IRES-Site, als auch das MACC1- bzw. MACC1 Δ SH3-Gen inklusive der Schnittstellen.

Kontrollspaltungen und Sequenzierungen bestätigten den korrekten Einbau sowohl für das Reporter-gen Luciferase als auch für das MACC1- bzw. MACC1 Δ SH3-Gen in allen drei generierten pIRES-Konstrukten.

3.1.1 Klonierung von Luciferase-IRES

Das Konstrukt Luciferase-IRES dient als Kontrollkonstrukt. In den pIRES-Vektor wurde als Einziges das Reporter-gen Luciferase in die multiple cloning site A des pIRES-Vektors kloniert. Das Restriktionsenzym Aval weist drei Schnittstellen in dem Reporter-gen Luciferase auf, weshalb Aval besonders geeignet ist, um den Unterschied eines pIRES-Leervektors und eines erfolgreich klonierten Luciferase-IRES-Konstruktes nach Kontrollspaltung darzustellen.

Die Bandenverteilung des abgebildeten Gels (Abb. 3.1) zeigt das typische Verteilungsmuster, was auf eine erfolgreiche Klonierung des Konstruktes Luciferase-IRES schließen lässt.

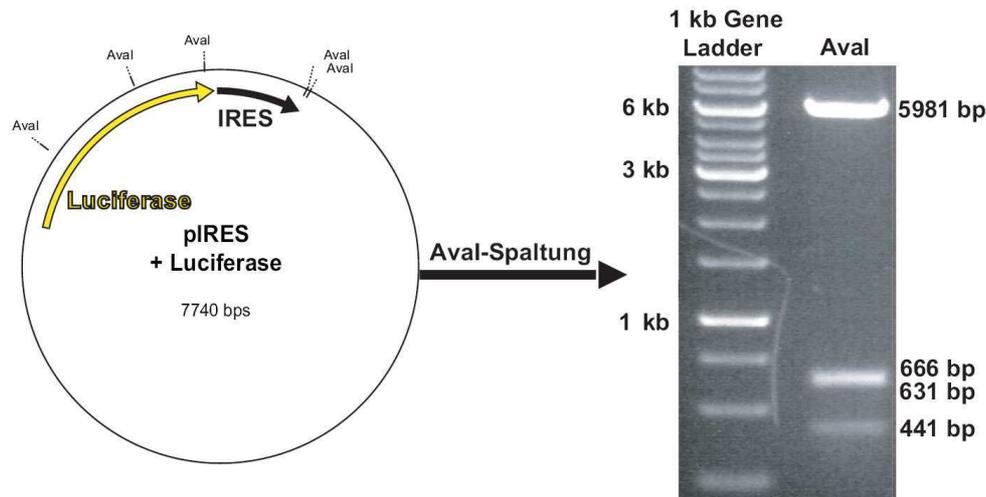


Abb. 3.1: Aval-Konstruktspaltung des Konstruktes Luciferase-IRES. Das Restriktionsenzym Aval weist in dem Konstrukt Luciferase-IRES fünf Schnittstellen auf und erzeugt so nach erfolgreichem Verdau fünf Fragmente in den Längen von 5989 bp, 666 bp, 631 bp, 441 bp und 21 bp. Auf dem abgebildeten Gel werden aufgrund des geringen Größenunterschiedes die beiden 666 bp und 631 bp großen Fragmente als eine Bande dargestellt. Das 21 bp große Fragment ist aufgrund seiner geringen Größe nicht abgebildet.

Für die vollständige Sequenzierung des Luciferase Reportergens und der IRES-Site wurden drei long-read Sequenzierungen durchgeführt. Die Überprüfung der Sequenzierungen ergab den korrekten Einbau des Reportergens und keinen Anhalt auf Mutationen im sequenzierten Bereich. Das dargestellte Alignment (Abb. 3.2) wurde mit dem Programm Clone Manager 6 erstellt.

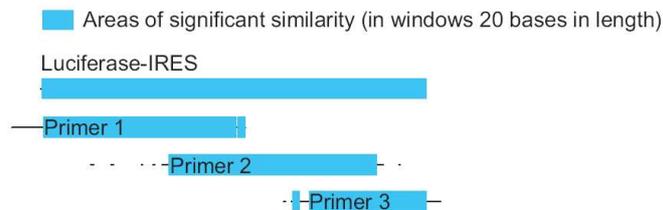


Abb. 3.2: Alignment der Sequenzierung des Konstruktes Luciferase-IRES. Dargestellt ist das vollständige Alignment des Reportergens Luciferase und der IRES-Site aus dem Konstrukt Luciferase-IRES.

3.1.2 Klonierung von Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3

Durch das Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 soll der Einfluss der SH3-Domäne auf die Funktion von MACC1 evaluiert werden. Dazu wurde in das zuvor generierte Konstrukt Luciferase-IRES das Gen MACC1 Δ SH3 in die multiple cloning site B des pIRES-Vektors kloniert.

Wegen der günstigen Verteilung seiner Erkennungssequenz in diesem Konstrukt wurde für die Kontrollspaltung wieder das Restriktionsenzym Aval verwendet. Es weist sechs

Schnittstellen auf, wobei sich drei in dem Luciferase-Gen befinden und jeweils eine Schnittstelle in der IRES-Site, in MACC1 Δ SH3 und im pIRES-Vektor.

Das abgebildete Gel (Abb. 3.3) bestätigt die Deletion der SH3-Domäne und die erfolgreiche Klonierung des Konstruktes.

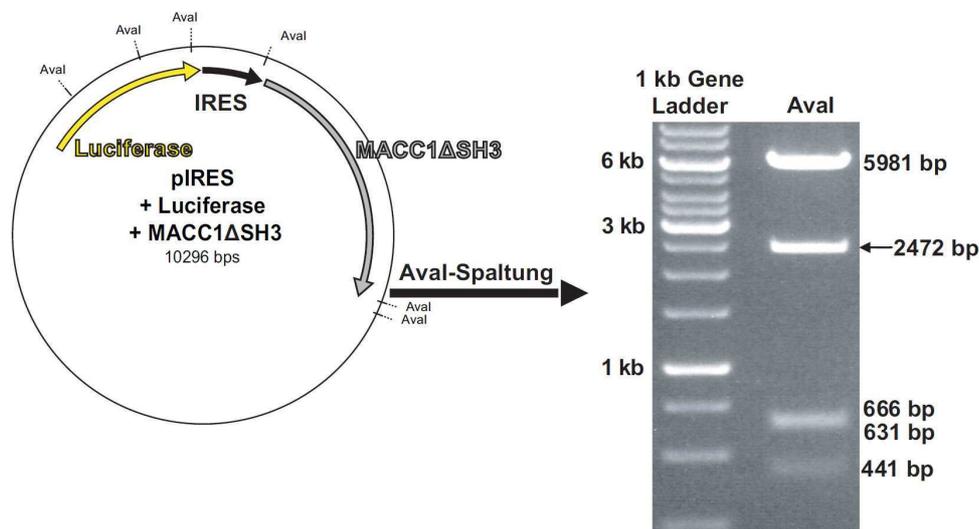


Abb. 3.3: Aval-Kontrollspaltung des Konstruktes Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3. Aval weist im Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 sechs Schnittstellen auf. Davon befinden sich drei in dem Reportergen Luciferase und jeweils eine Schnittstelle in der IRES-Site, am 3'-Ende von MACC1 Δ SH3 und im pIRES-Vektor. Die einzelnen Fragmente sind nach erfolgreicher Spaltung 5989 bp, 2472 bp (\leftarrow), 666 bp, 631 bp, 441 bp und 105 bp groß. Auf dem dargestellten Gel erscheinen die beiden 666 bp und 631 bp großen Fragmente wegen des geringen Größenunterschiedes als ein Bande und das 105 bp große Fragment ist wegen seiner geringen Größe nicht dargestellt.

Für die vollständige Sequenzierung des Reportergens Luciferase, der IRES-Site und des Gens MACC1 Δ SH3 wurden acht long-read Sequenzierungen durchgeführt. Sie ergaben keinen Anhalt für Mutationen im sequenzierten Bereich und bestätigten den korrekten Einbau in die multiple cloning sites A und B.

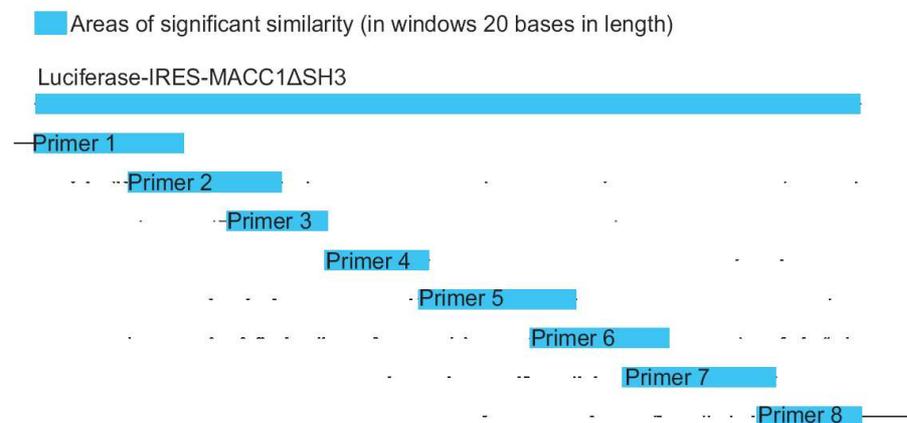


Abb. 3.4: Alignment der Sequenzierung des Konstruktes Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3. Dargestellt ist das mittels Clone Manager 6 erstellte Alignment des Reportergens Luciferase, der IRES-Site und von MACC1 Δ SH3.

3.1.3 Klonierung von Luciferase-IRES-MACC1

Durch die Generierung eines Konstruktes, welches das Reportergen Luciferase und das Gen MACC1 in einem gemeinsamen Vektor enthält, soll erreicht werden, dass stabile Transfektanten dieses Konstruktes die Fähigkeit sowohl für die Expression von Luciferase als auch von MACC1 aufweisen.

Zur Überprüfung des Erfolges der Klonierung wurde auch in diesem Fall das Restriktionsenzym Aval für die Kontrollspaltung benutzt. Aval schneidet dieses Konstrukt siebenmal, wobei sich drei Schnittstellen im Luciferase-Gen befinden, zwei im MACC1-Gen (in der SH3-Domäne und am 3'-Ende) und jeweils eine Schnittstelle in der IRES-Site und in dem pIRES-Vektor.

Das Gel (Abb. 3.5) bestätigt den Erfolg der Klonierung durch die zu erwartende Bandenverteilung.

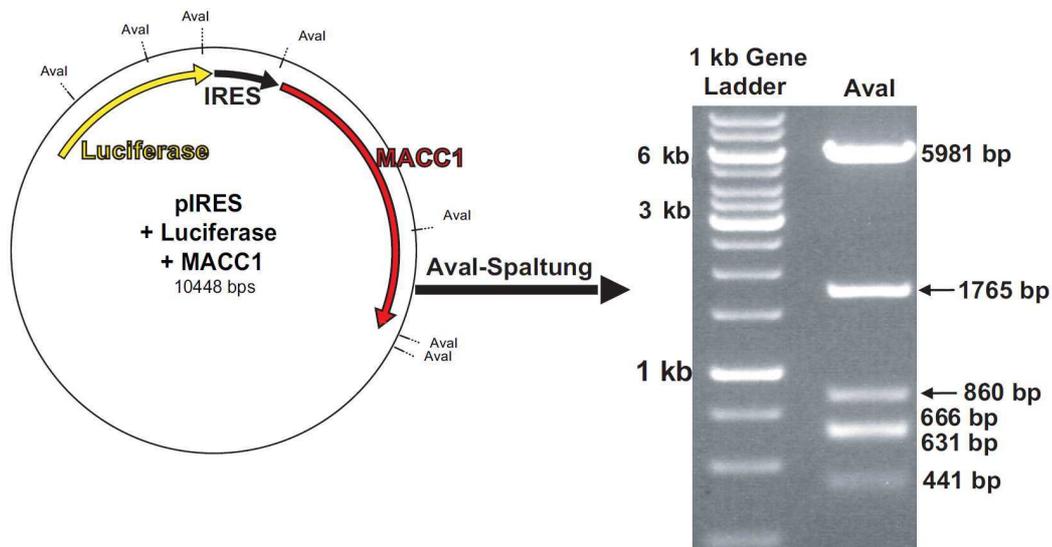


Abb. 3.5: Aval-Kontrollspaltung des Konstruktes Luciferase-IRES-MACC1. Aval schneidet das Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 siebenmal. Die einzelnen Fragmente weisen nach erfolgreicher Spaltung Größen von 5989 bp, 1765 bp (←), 860 bp (←), 666 bp, 631 bp, 441 bp und 104 bp auf. Wie auch schon bei den Gelen von Abb. 3.1 und 3.3 erscheinen die beiden 666 bp und 631 bp großen Fragmente aufgrund des geringen Größenunterschiedes auf dem Gel als eine Bande und das 104 bp große Fragment ist wegen seiner geringen Größe nicht dargestellt.

Die Auswertung der neun long-read-Sequenzierungen ergab keinen Anhalt für Mutationen im Bereich vom Reportergen Luciferase, der IRES-Site und des MACC1-Gens und bestätigte den korrekten Einbau in die multiple cloning sites A und B.

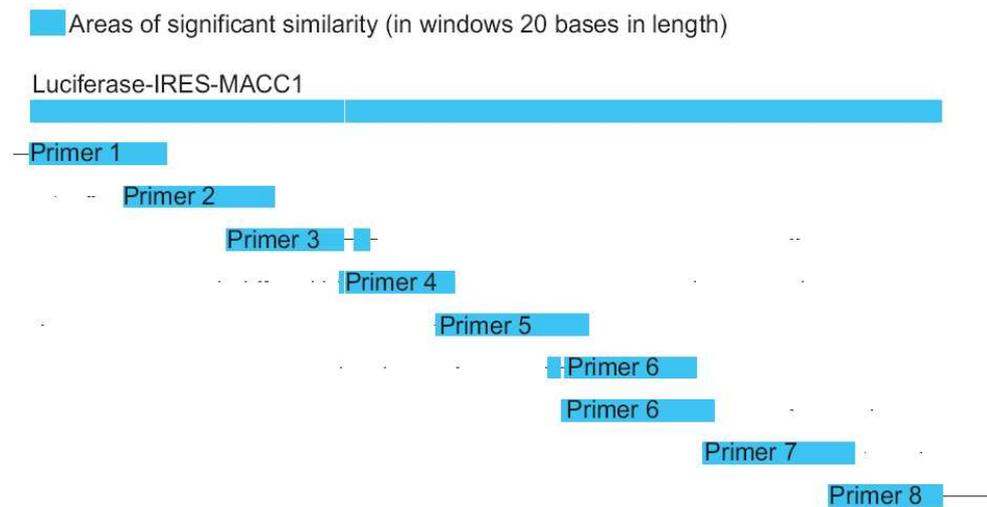


Abb. 3.6: Alignment der Sequenzierung des Konstruktes Luciferase-IRES-MACC1.

3.2 Expressionsanalysen

Nachdem der Erfolg der Klonierung aller drei generierten Konstrukte durch Kontrollspaltungen und Sequenzierungen bestätigt wurde, erfolgte die stabile Transfektion der Konstrukte in die parentale Kolonkarzinomzelllinie SW480. SW480-Zellen wurden dem Primärtumor eines Patienten entnommen, der zum Zeitpunkt der Resektion noch keine Metastasen aufwies. SW480-Zellen weisen intrinsisch eine sehr geringe Expression von MACC1 auf, weshalb sie für die Transfektion mit den erzeugten Konstrukten besonders geeignet sind. Die transfizierten Zellen wurden auf ihre G418-Resistenz selektiert und sowohl die Expressionsrate des Reportergens als auch die Transkription und Translation von MACC1 bzw. MACC1 Δ SH3 in den Klonen untersucht. Dadurch gelang es eine Auswahl der Klone zu treffen, die für die weiterführenden Motilitäts-Assays und das In-vivo-Imaging benutzt wurden.

3.2.1 Steigerung der Luciferaseaktivität in den stabilen Zellklonen

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte durch Absorption der Lumineszenz, die durch das Reportergen Luciferase in den stabil transfizierten Zellen erzeugt wurde. Nach erfolgreicher Transfektion mit einem der drei generierten Konstrukte sollte die Luciferaseaktivität im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 stark gesteigert sein. Die Luciferaseaktivität wurde als n-facher Wert bezogen auf die parentale Zelllinie SW480 angegeben. Die Luciferaseaktivität der drei erzeugten Zellklone war im Vergleich zu SW480-Zellen um mehr als 40fach gesteigert. Die Ergebnisse aller drei

stabilen Transfektanten waren in Bezug auf die Luciferaseaktivität der parentalen Zelllinie signifikant erhöht (p-Wert < 0,001)

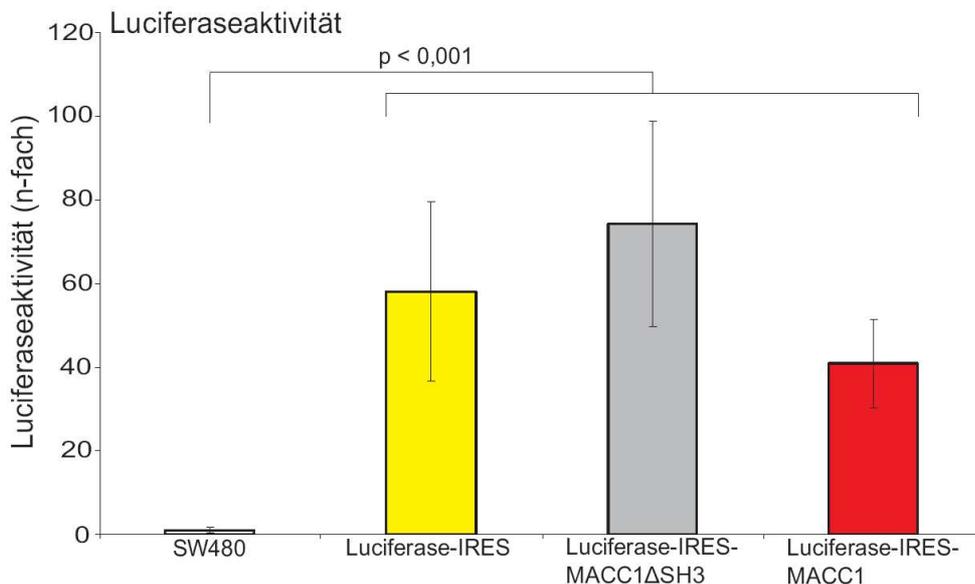


Abb. 3.7: Messung der Luciferaseaktivität der drei erzeugten Zellklone im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480. Die Luciferaseaktivität der drei stabilen Transfektanten war im Vergleich zur parentalen Zelllinie stark erhöht. Zellen, die mit dem Konstrukt Luciferase-IRES stabil transfiziert wurden [gelb], hatten eine 58fach gesteigerte Luciferaseaktivität im Vergleich zu SW480. Die Luciferaseaktivität in den stabilen Transfektanten mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1ΔSH3 [grau] bzw. Luciferase-IRES-MACC1 [rot] war um mehr als 78fach bzw. 40fach gesteigert. Die Ergebnisse der drei stabil transfizierten Zellklone erzielten alle in Bezug auf die parentale Zelllinie SW480 Signifikanz (p-Wert < 0,001).

3.2.2 Steigerung der MACC1-Transkription und -Translation

Die stabilen Transfektanten wurden mittels quantitativer real-time RT-PCR und Western Blot hinsichtlich ihrer MACC1-Expression evaluiert. Die ermittelten Werte der MACC1-mRNA-Expression wurden auf das Housekeeping-Gen G6PDH normalisiert und als n-fache Induktion im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 angegeben. Stabile Transfektanten mit dem Konstrukt Luciferase-IRES wiesen keine gesteigerte Induktion der MACC1-mRNA-Expression auf (0,8fach). In Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES-MACC1ΔSH3 bzw. -MACC1 wurde hingegen die MACC1-mRNA-Expression 303fach bzw. 142fach gesteigert.

Das MACC1-Protein wurde über den V5-Antikörper mittels Western Blot ebenfalls ausschließlich bei den Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES-MACC1ΔSH3 bzw. -MACC1 nachgewiesen.

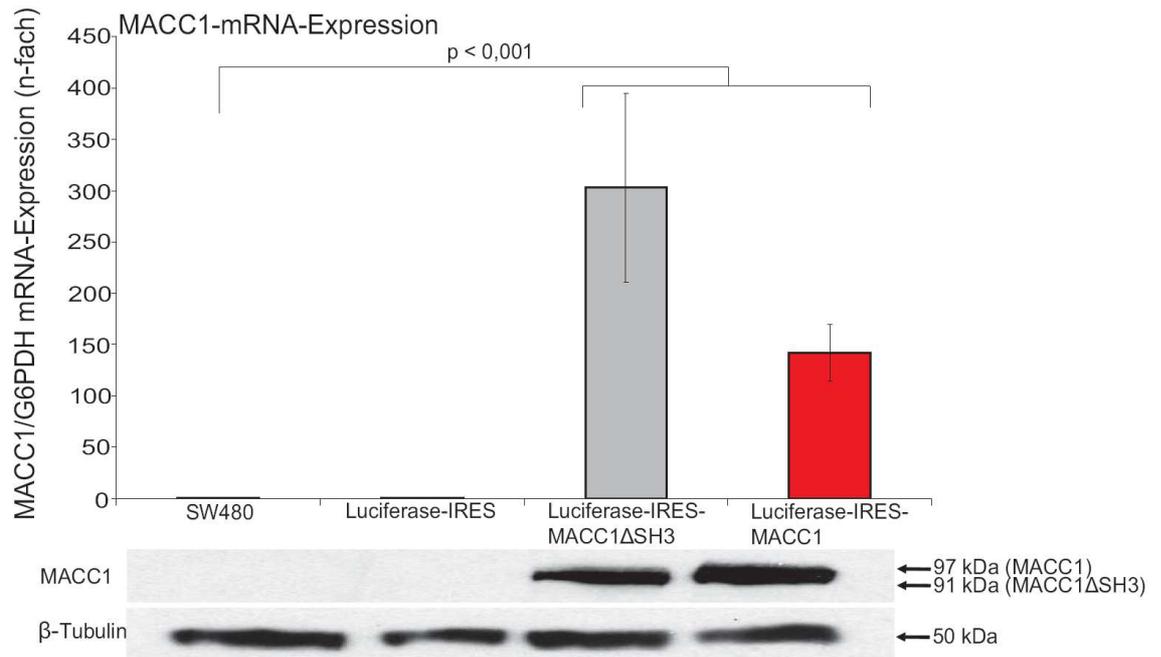


Abb. 3.8: MACC1-Expression in stabil transfizierten Tumorzellen. Dargestellt ist die MACC1-Expression in der parentalen Zelllinie SW480 im Vergleich zu den drei stabil transfizierten Klonen. Die MACC1-mRNA-Expressionslevel wurden mittels quantitativer real-time RT-PCR bestimmt und auf das Housekeeping-Gen G6PDH normalisiert. Die Angabe der ermittelten Werte erfolgte als n-fache Induktion im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480. Um neben der Translation auch die Transkription zu überprüfen, wurde das MACC1-Protein mittels V5-spezifischen Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Das zytoskeletale Protein β -Tubulin diente dabei als Ladekontrolle. Die Expression von MACC1-mRNA ist ausschließlich in den Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 [grau] bzw. -MACC1 [rot] gesteigert. Die parentale Zelllinie SW480 und Transfektanten mit dem Kontrollkonstrukt Luciferase-IRES exprimieren hingegen keine MACC1-mRNA. Der dargestellte Western Blot weist das MACC1-Protein ebenfalls ausschließlich für die Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 bzw. -MACC1 nach.

3.3 Motilitätsanalysen

Metastatische Tumorzellen zeichnen sich durch eine gesteigerte Motilität aus. Durch diese Eigenschaft gelingt es ihnen, Gewebe zu durchwandern und in distanten Organen zu proliferieren. Die Motilität einzelner Zellen kann durch Migrations-Assays und Invasions-Assays untersucht werden. Dazu wurden Boyden Chambers mit definierter Porengröße verwendet, die von den Tumorzellen aktiv durchwandert werden mussten. Im Falle des Invasions-Assays wurde der Membranboden zusätzlich mit polymerisiertem Matrigel bedeckt. Die Zahl der migrierten bzw. invadierten Zellen wurde ausgezählt und als n-facher Wert bezogen auf die parentale Zelllinie SW480 angegeben.

3.3.1 Migrationsinduktion durch MACC1

Eine Steigerung des migratorischen Potentials ist eine entscheidende Eigenschaft von Tumorzellen, die MACC1 überexprimieren.⁸¹ Zur Analyse der erzeugten Zellklone bot sich daher der Migrations-Assay nach Boyden an, um den Erfolg der Transfektion in vitro zu bestätigen und eine Auswahl der Klone für das folgende In-vivo-Imaging zu treffen.

Nach Ablauf von 24 h waren ausschließlich Transfektanten mit dem Wildtyp MACC1-Konstrukt signifikant stärker migriert. Das migratorische Verhalten der MACC1 überexprimierenden Zellen war – verglichen mit der parentalen Zelllinie SW480 – ca. 5fach erhöht. Zellen, die MACC1 Δ SH3 überexprimierten, und Zellen, die mit dem Kontrollkonstrukt stabil transfiziert wurden, wiesen keine signifikant erhöhte Migration auf (1,4fach bzw. 1,6fach im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480).

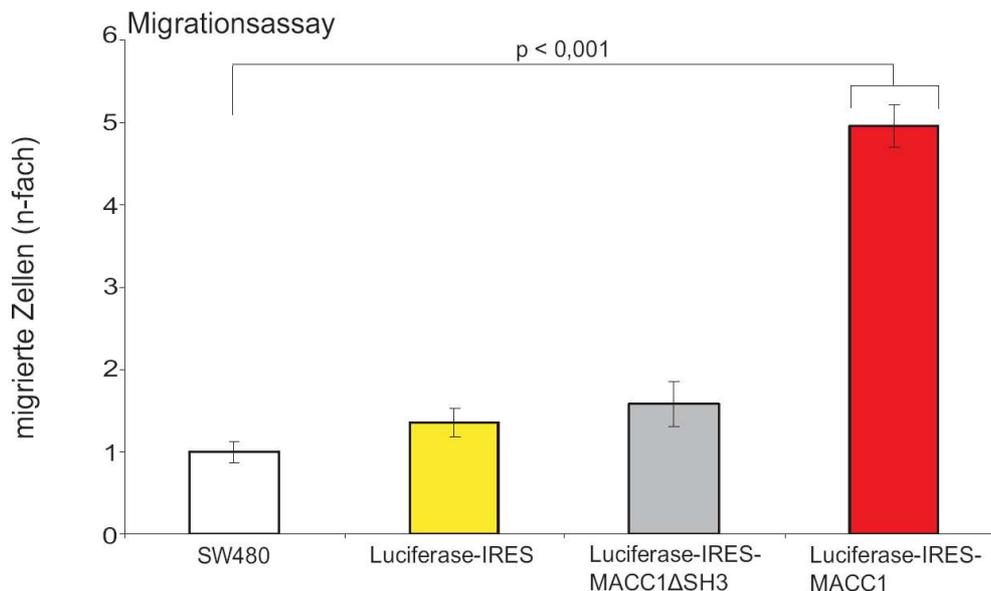


Abb. 3.9: Migrationssteigerung des Wildtyp-MACC1-Transfektanten. Nur der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 [rot] weist ein signifikant gesteigertes migratorisches Verhalten im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 auf (5fach gesteigert, p-Wert < 0,001). Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES [gelb] und Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 [grau] migrieren hingegen nicht signifikant verstärkt (1,4fach und 1,6fach, p > 0,05).

3.3.2 Invasionsinduktion durch MACC1

Die Invasion ist ein wichtiges Kriterium, welches das metastatische Potential von Tumorzellen determiniert.⁹⁵ MACC1 reguliert die Invasivität von Tumorzellen. Daher zeichnen sich Zellen, die MACC1 überexprimieren, durch eine gesteigerte Invasivität aus.⁸¹

Nach 72 h wurde ausgezählt, wie viele Zellen durch die mit Matrigel beschichtete Membran der Boyden Chambers gewandert sind. Die Analysen ergaben, dass nur Transfektanten mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 ein signifikant gesteigertes invasives Potential aufweisen (3,7fach, p-Wert < 0,05). Zellen, die mit dem Konstrukt Luciferase-IRES bzw. Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 stabil transfiziert wurden, wiesen kein gesteigertes invasives Verhalten auf (0,8fach bzw. 0,2fach verglichen mit SW480).

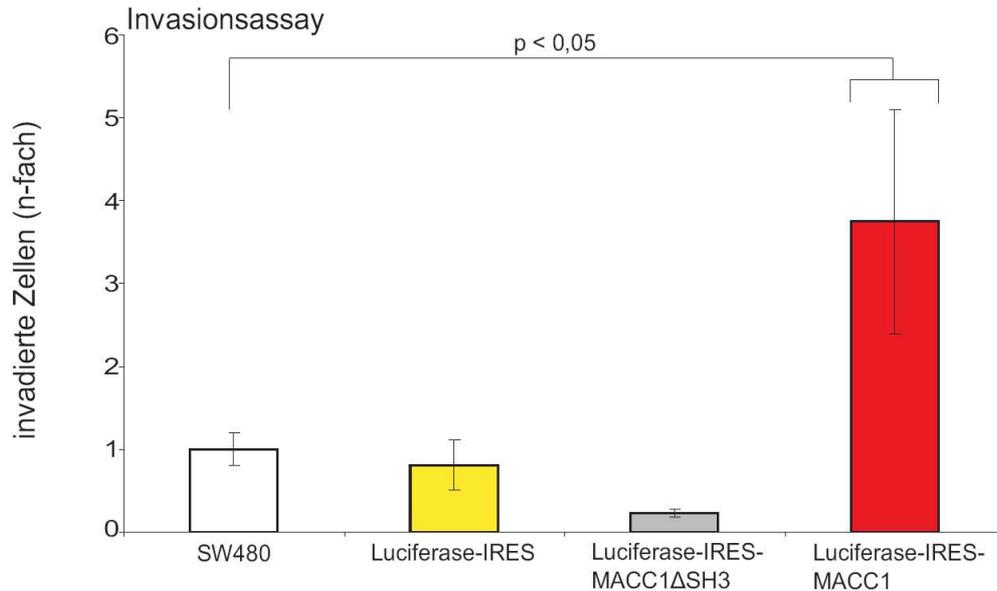


Abb. 3.10: Invasionssteigerung des Wildtyp-MACC1-Transfektanten. Ausschließlich Zellen, die MACC1 überexprimierten, wiesen eine gesteigerte Invasion auf. Bezogen auf die parentale Zelllinie SW480 war die Invasion von Transfektanten mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 [rot] 3,7fach erhöht. Bei Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES [gelb] und Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 [grau] wurde hingegen im Vergleich zu SW480-Zellen keine gesteigerte Invasion festgestellt (0,8fach bzw. 0,2fach)

3.4 In-vivo-Imaging des Xenograft-Mausmodells

Der Tierversuch im vorliegenden Projekt basiert auf den Ergebnissen von bereits durchgeführten Endpunktbestimmungen in der AG Stein.⁸³ Dadurch konnte der metastasierungsinduzierende Effekt von MACC1 bereits eindeutig gezeigt werden. MACC1 wurde dazu im pcDNA3.1-Vektor in SW480- und SW620-Zellen und in die Zelllinie LS174T transfiziert und die Endpunktbestimmungen zeigten einen deutlichen Anstieg der Lebermetastasen, welcher mit der Expression von MACC1 korrelierte. In dieser Arbeit konnte an diese Ergebnisse angeknüpft werden. Durch die Klonierung des Reportergens Luciferase und von MACC1 in einen gemeinsamen pIRES-Vektor wurde sichergestellt, dass beide Gene zusammen transfiziert werden, was die Aussagekraft der In-vivo-Aufnahmen erhöht. Durch die stabile Expression der Luciferase und das non-invasive Imaging konnten die Versuchstiere außerdem über einen mehrwöchigen Zeitraum konstant beobachtet werden und die erhobenen Daten wurden durch die Endpunktaufnahmen ergänzt.

Für das In-vivo-Imaging wurden sieben Wochen alte SCID-Mäuse verwendet. Durch intrasplenale Injektion in PBS dissoziierter Tumorzellen des jeweiligen Zellklons wurde ein Primärtumor in der Milz erzeugt. Die Tumorzellapplikation und die nachfolgenden Messungen wurden für alle Versuchsgruppen am jeweils gleichen Tag durchgeführt.

Für eine bessere Übersicht wurde von den erzeugten Fluoreszenzaufnahmen für jede Maus eine Auswahl von neun Versuchstagen getroffen, die in der korrekten zeitlichen Abfolge abgebildet sind und im Text beschrieben werden. Die Darstellung der Versuchstiere erfolgt immer in gleicher Weise: als Erstes ist durch eine Farbskala die Einteilung der Signalintensität dargestellt. Darunter befindet sich eine Auswahl von neun Aufnahmen, die zwischen Tag 6 bzw. 7 (Beginn) und Tag 32 bzw. 43 (Ende) angefertigt wurden. Der Tag der intrasplenalen Injektion wird hierbei als Tag 1 gewertet. Am letzten Tag des Imagings (Tag 32 bzw. 43) wurden zusätzlich, nach Tötung durch zervikale Dislokation, Aufnahmen der Maus mit geöffnetem Abdomen durchgeführt und sowohl die Leber als auch die Milz nach deren Präparation einzeln dargestellt. Die Farbkodierung der einzelnen Versuchsgruppen erfolgt auf dieselbe Weise wie bei den Ergebnisdarstellungen zuvor.

3.4.1 *In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit dem Kontrollkonstrukt Luciferase-IRES*

Alle Versuchstiere dieser Gruppe sind in Abb. 3.11 dargestellt. Das Imaging erfolgte über einen Zeitraum von 26 bzw. 38 Tagen.

Das erste Versuchstier der Kontrollgruppe weist sowohl in den ventralen als auch in den lateralen Aufnahmen ein stabiles Signal auf, das sich in seiner Intensität und Ausdehnung während des Imagings leicht steigert. Ursprung dieses Signals ist die Milz mit dem Primärtumor, wie die Aufnahme der präparierten Milz am Tag 43 zeigt.

Das Imaging eines anderen Versuchstieres wurde am Tag 32 beendet. Nach zervikaler Disklokation wurden Aufnahmen mit eröffnetem Abdomen und mit der einzeln präparierten Milz und Leber angefertigt. In den Biolumineszenzaufnahmen der einzeln präparierten Organe erkennt man in der Milz ein Signal ausgehend vom Primärtumor. Die Leber weist kein Signal auf.

Das nächste Versuchstier der Kontrollgruppe hat sowohl in den ventralen als auch in den lateralen Aufnahmen ein stabiles Signal, dessen Intensität und Ausdehnung über den Zeitraum des Imagings zunehmen. Die Aufnahmen mit den einzeln präparierten Organen und mit dem eröffneten Abdomen wurden nach zervikaler Dislokation am Tag 43 erstellt. Sie zeigen, dass zusätzlich zur Milz auch der linke äußere Leberrand Ursprung des Biolumineszenzsignals ist.

Insgesamt weisen alle Versuchstiere dieser Gruppe einen signalgebenden Primärtumor in der Milz auf. Die Signalintensitäten variieren zwischen den Versuchstieren. Bei einem Versuchstier wurde ein signalgebender Fokus am linken Leberrand nachgewiesen.



Abb. 3.11: Darstellung der Versuchstiere der Kontrollgruppe Luciferase-IRES.

3.4.2 *In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit MACC1 Δ SH3*

Die gesamten Versuchstiere der Gruppe Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 sind in Abb. 3.12 dargestellt. Die Imagingzeit betrug für alle Tiere dieser Versuchsgruppe 43 Tage. Am abschließenden Imagingtag wurden – wie bei den anderen Versuchsgruppen – nach zervikaler Dislokation das Abdomen der Tiere eröffnet und Milz und Leber einzeln präpariert.

Das erste Versuchstier dieser Gruppe weist über die gesamte Imagingzeit ein sichtbares Signal auf der linken Seite auf, was besonders gut in den lateralen Aufnahmen zu erkennen ist. Das Signal lässt mehrere Fokuse als Ursprung vermuten, was durch die Aufnahmen mit den einzeln präparierten Organen bestätigt wird. Ein Fokus liegt in der Milz, wo die Tumorzellen injiziert wurden. Mehrere sehr kleine Fokuse sind am Leberrand lokalisiert.

Das nächste Versuchstier lässt nur in drei lateralen Aufnahmen ein linksseitig von der Milz ausgehendes Signal erkennen. Die Aufnahme mit der präparierten Milz beweist jedoch, dass in der Milz ein Primärtumor angewachsen ist. Die Leber ist signalfrei.

Ein anderes Versuchstier zeigt zu Beginn des Imagings noch ein schwaches Signal, was linksseitig vor allem in den lateralen Aufnahmen zu erkennen ist. Die Signalintensität schwächt jedoch über den Beobachtungszeitraum ab und ist gegen Ende des Imagings sowohl in den ventralen als auch in den lateralen Aufnahmen nicht mehr zu erkennen. Die Aufnahmen mit dem eröffneten Abdomen zeigen jedoch, dass linksseitig ein signalbildender Fokus existiert. Die Aufnahmen mit der einzeln präparierten Milz und Leber beweisen, dass der Ursprung dieses Signals sowohl von Milz als Sitz des Primärtumors ausgeht als auch von der Leber. Die Leber lässt mehrere kleine Signalfokuse erkennen.

Insgesamt wiesen alle Versuchstiere dieser Gruppe einen Primärtumor in der Milz auf. In den Lebern von zwei Tieren bestanden zusätzlich zur Milz mehrere kleine Signalfokuse.

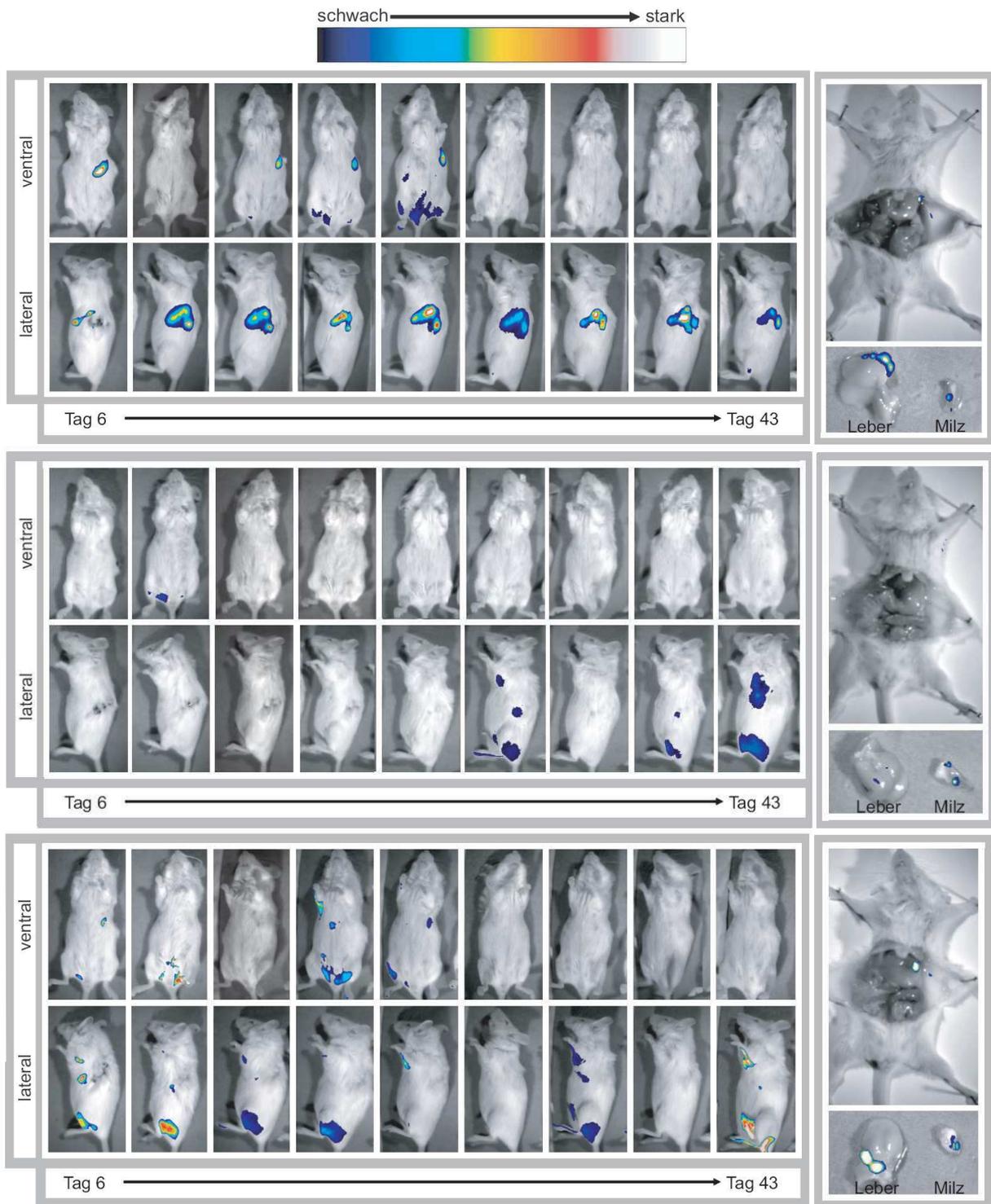


Abb. 3.12: Darstellung der Versuchstiere der Gruppe mit mutiertem MACC1 (Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3).

3.4.3 *In-vivo-Imaging der Versuchsgruppe mit MACC1*

Die Versuchstiere der Gruppe Luciferase-IRES-MACC1 sind in Abb. 3.13 dargestellt. Die Imagingzeit für diese Versuchsgruppe betrug 26 bzw. 38 Tage.

Das erste Versuchstier dieser Gruppe zeigt bereits zu Beginn des Imagings ein starkes Signal, was linksseitig lokalisiert ist und besonders in den lateralen Aufnahmen zu sehen ist. Dieses linkslaterale Signal steigert seine Intensität während des Imagings kontinuierlich und dehnt sich immer weiter nach medial aus. Auf der rechtslateralen Seite ist ebenfalls ein kleiner Signalfokus zu erkennen, der in einigen ventralen Aufnahmen zu sehen ist. Die Aufnahme mit dem eröffneten Abdomen zeigt ein weit ausgebreitetes Signal. Die über das Foto gelagerte Biolumineszenz-Aufnahme überdeckt fast das gesamte Abdomen. In den einzeln präparierten Organen ist erkennbar, dass die Milz Ursprung eines sehr starken Signals ist, was die Milz nahezu komplett überlagert. In der Leber ist ebenfalls ein Signal mit hoher Intensität zu erkennen. Das Lebersignal lässt verschiedene Fokusse erahnen, die sich jedoch schlecht differenzieren lassen.

Das Imaging des nächsten Versuchstieres beginnt am Tag 7. Bereits zu Anfang des Imagings ist vor allem in den lateralen Aufnahmen ein Signal mit hoher Intensität zu erkennen, das sich über den weiteren Beobachtungszeitraum linksseitig immer weiter ausdehnt. Die ventralen Aufnahmen zeigen an einigen Tagen kleine Signalfokusse, die äußerst medial des Abdomens lokalisiert sind. Die Aufnahme mit dem eröffneten Abdomen zeigt diesen medialen Signalfokus und zusätzlich etwas lateral unter dem Rippenbogen einen weiteren. Die Aufnahme mit der einzeln präparierten Milz und Leber zeigen ein deutliches Signal ausgehend vom Primärtumor in der Milz und mehrere kleine voneinander separierte Signale in der Leber.

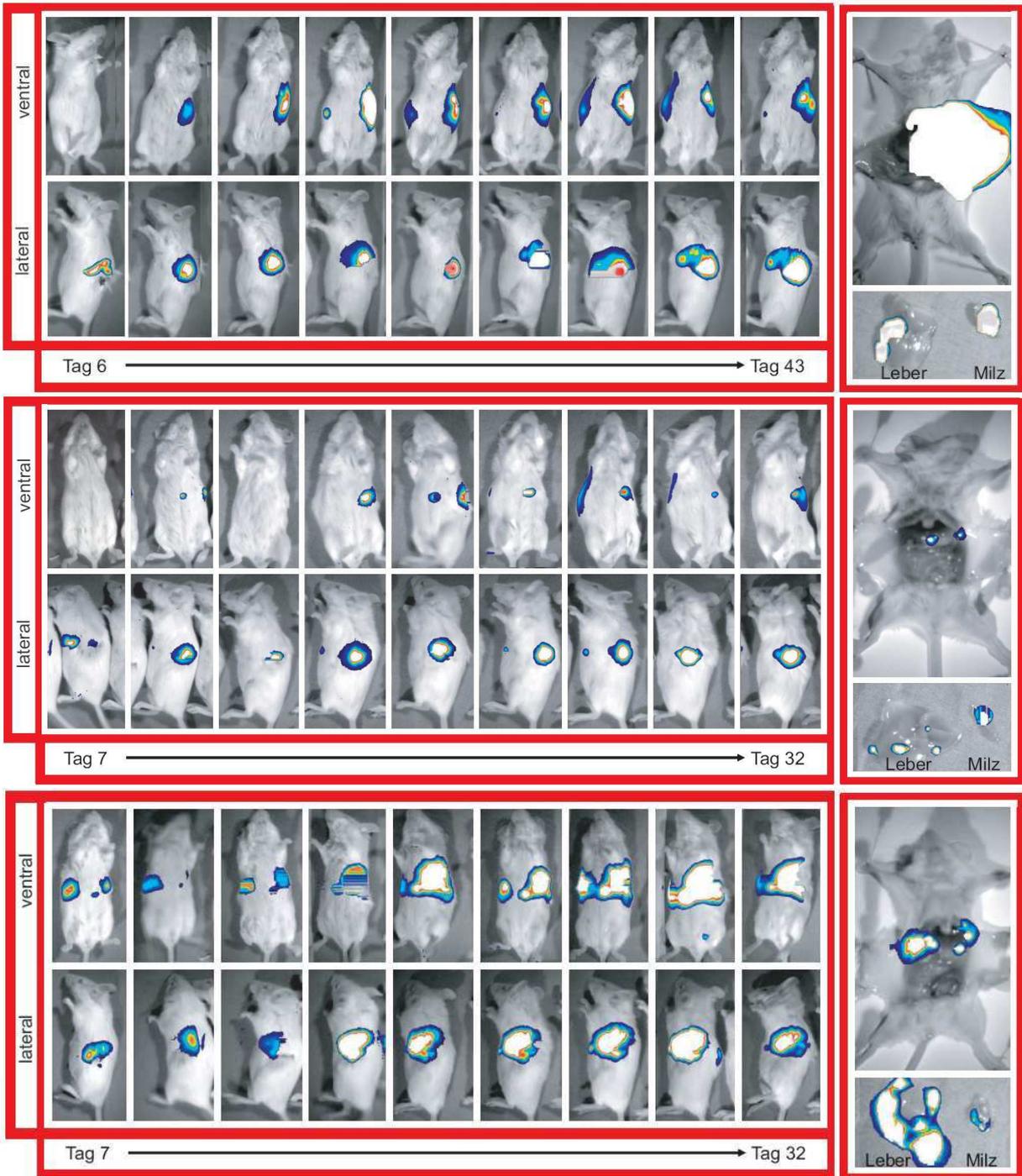
Ein anderes Versuchstier weist bereits am Tag 7 ein stabiles Signal sowohl linkslateral als auch rechtslateral auf. Über den weiteren Beobachtungszeitraum steigert sich vor allem die Intensität des linkslateral lokalisierten Signals. Gegen Ende des Beobachtungszeitraums kann man kaum zwischen den verschiedenen Signalfokussen differenzieren. Die Aufnahme mit dem eröffneten Abdomen zeigt sowohl links- als auch rechtslateral mehrere Signalquellen, die direkt unterhalb des Rippenbogens lokalisiert sind. Nach Präparation der Milz und der Leber lässt sich ein kleines Signal in der Milz erkennen, wo die Tumorzellen injiziert wurden und mehrere Signale mit hoher Intensität

in der Leber. Die Lebersignale scheinen über das gesamte Organ verteilt zu liegen und lassen sich gut voneinander abgrenzen. Das Biolumineszenzsignal ist so stark, dass das Schwarz/Weiß-Foto größtenteils durch die Biolumineszenzaufnahme überdeckt wird.

Ein Versuchstier entwickelte ebenfalls anfangs ein linkslateral lokalisiertes Signal mit hoher Intensität. Die Intensität und die Ausdehnung des Signals nahmen während des Beobachtungszeitraums zu. Die Ausbreitung des Signals erfolgte dabei vor allem nach medial. Die Aufnahme mit dem eröffneten Abdomen zeigt wie bei dem Versuchstier zuvor ein starkes Signal auf Höhe des Rippenbogens. Die präparierte Milz weist ein äußerst kleines Signal auf. Jedoch wird im Unterschied zur Milz die Schwarz/Weiß-Aufnahme der Leber nahezu vollständig von der Biolumineszenzaufnahme überlagert.

Das letzte Versuchstier weist über den gesamten Beobachtungszeitraum auf der linkslateralen Seite ein kreisförmiges Signal hoher Intensität auf. In der Aufnahme mit dem eröffneten Abdomen ist dieses nicht erkennbar, jedoch beweist die Aufnahme mit der präparierten Milz, dass der intrasplenale Primärtumor Ursprung dieses linkslateralen Signals ist. Die Leber weist am Rand einige streifenförmige Signale auf.

Insgesamt entwickelten alle Versuchstiere dieser Gruppe Primärtumore in der Milz, die bei drei Mäusen über den Beobachtungszeitraum vergleichsweise stark an Größe zugenommen haben. Außerdem wiesen nahezu alle Versuchstiere mehrere Signale in der Leber auf.



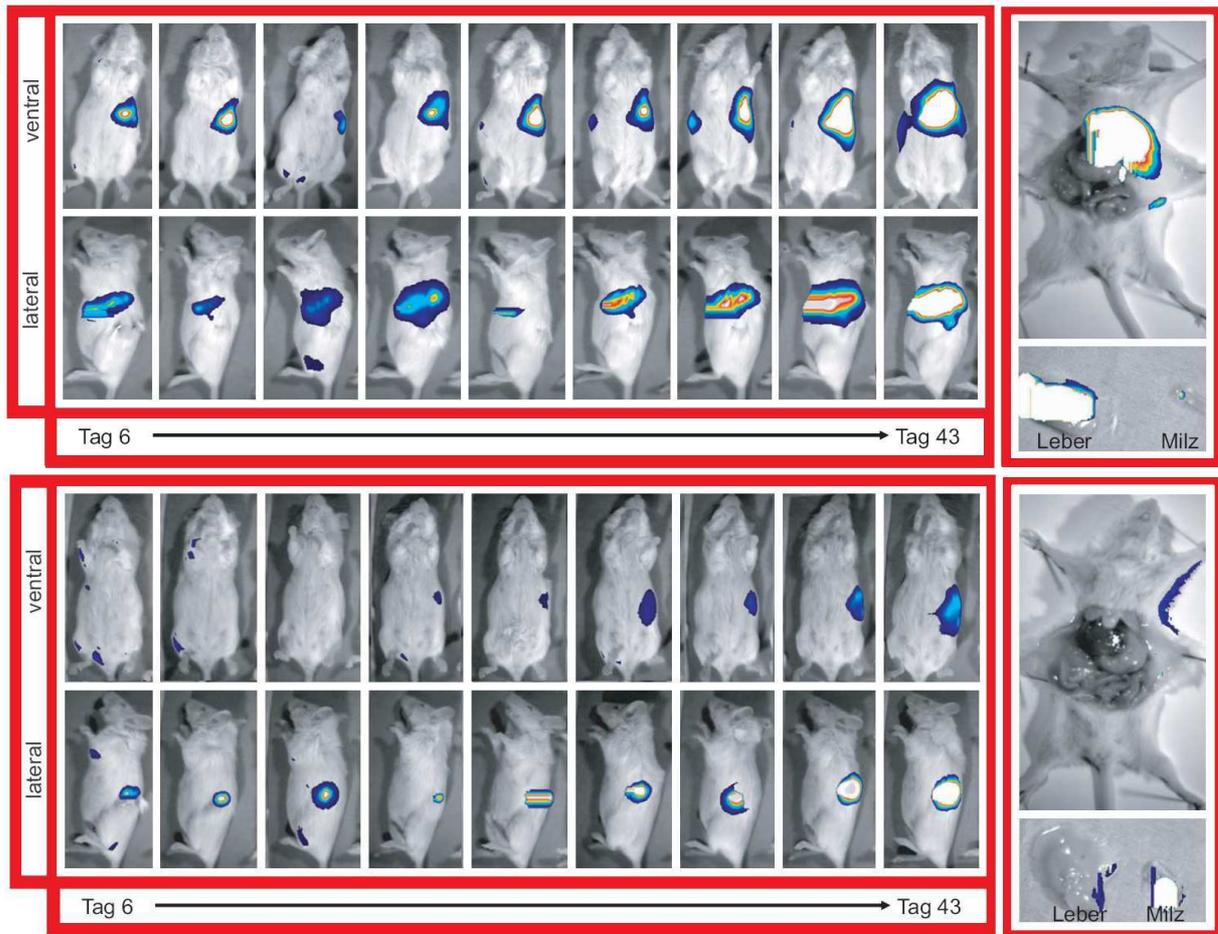


Abb. 3.13: Darstellung der Versuchstiere der Gruppe Luciferase-IRES-MACC1.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom

Der limitierende Faktor für die Überlebenserwartung von Patienten mit kolorektalem Karzinom ist die Metastasierung.⁵⁷ Das am häufigsten präferierte Zielorgan der distanten Metastasierung ist die Leber.²⁷ Bei zwei Drittel aller Patienten mit kolorektalem Karzinom sind zum Zeitpunkt des Todes Lebermetastasen vorhanden.⁹⁶ Bei der Hälfte aller Patienten mit kolorektalem Karzinom werden die Lebermetastasen klinisch apparent. Die chirurgische Resektion des Primärtumors ist die Therapie der Wahl und dennoch entwickeln Patienten in 40% der Fälle nach der Resektion Lebermetastasen.

MACC1 konnte in vorangehenden Projekten unserer Arbeitsgruppe aus Primärtumoren des kolorektalen Karzinoms und deren distanten Metastasen als überexprimierendes Gen isoliert werden. Des Weiteren konnte erfolgreich die Steigerung von metastasierungsassoziierten Parametern wie Proliferation, Migration und Invasion durch MACC1 nachgewiesen werden und als zugrundeliegender zellulärer Mechanismus wurde die Interaktion von MACC1 im HGF-Met-Signalweg bestätigt. Bei der Auswertung von Patientendaten, zeigte sich, dass das metastasefreie Überleben bei Patienten, die MACC1 überexprimieren, signifikant erniedrigt ist. In Versuchsreihen mit Mäusen konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen Metastaselast und MACC1-Expression nachgewiesen werden, jedoch erfolgte die Darstellung der Metastasierung mittels Endpunktbestimmungen und nicht non-invasiv über einen konstanten Zeitraum.

Im Rahmen dieses Projektes wurde MACC1 zusammen mit dem Reporter gen Luciferase in einen gemeinsamen pIRES-Vektor kloniert. Die Vorteile eines IRES-Konstruktes sind die effiziente Ko-Transfektion von zwei Genen aufgrund der Expression der beiden Gene in einem gemeinsamen Expressions-Vektor und die minimalen Auswirkungen auf die biologische Aktivität der exprimierten Proteine. Anfänglich wurde auch die Verwendung eines Fusionsproteinvektors für diese Arbeit diskutiert, jedoch wurde dies nicht durchgeführt, da durch Erzeugung eines Fusionsproteins die korrekte biologische Funktion in zellulären Mechanismen viel unsicherer gewesen wäre als unter Verwendung eines IRES-Vektors. Ein IRES-Konstrukt eignet sich vor allem bei Reporter gen-Assays, denn durch die gleichzeitige Expression eines Reporter gens kann die Effizienz der Transfektion des GOIs (Gene of

Interest) analysiert werden. Dadurch konnte im vorliegenden Projekt über die gemessene Luciferaseaktivität indirekt die MACC1-Expression bestimmt werden und in vivo mittels non-invasiver Biolumineszenzmessungen die Metastasierung dargestellt werden. Die Expression des Reportergens Luciferase und von MACC1 in einem gemeinsamen IRES-Vektor ist bisher noch nicht erfolgt. Zuvor wurden zwei unabhängige Konstrukte benutzt, was viele Nachteile und Unsicherheiten mit sich brachte. Die im Rahmen dieses Projektes klonierten Vektoren steigern die Effektivität der Ko-Transfektion beider Transgene im Vergleich zu der bisher durchgeführten Transfektion mittels zweier unabhängiger Konstrukte und das In-vivo-Imaging erreicht dadurch eine höhere Aussagekraft, denn die Detektion der Luciferase und die Expression von MACC1 haben durch die Transfektion in einem gemeinsamen Vektor einen direkten Zusammenhang. Die Klonierung der verwendeten IRES-Konstrukte stellt im Vergleich zu bisher durchgeführten Projekten der MACC1-induzierten Metastasierung eine wichtige Innovation dar und gewährleistet im hohen Maße die Sicherheit für die korrekte biologische Funktion der Transgene.

Vor dem Tierversuch wurden mit den erzeugten Konstrukten eingehende In-vitro-Voruntersuchungen durchgeführt, durch die eine Korrelation zwischen Luciferase-Expression und MACC1-Expression in den erzeugten Konstrukten gezeigt werden konnte und ebenfalls eine signifikante Steigerung der metastasierungsassoziierten Parameter durch Überexpression von MACC1 beobachtet wurde. Im durchgeführten Tierversuch zeigte die Gruppe mit MACC1 im Vergleich zu den Gruppen mit dem Kontrollkonstrukt und mit mutiertem MACC1 ein verstärktes Biolumineszenzsignal, was auf ein stärkeres Wachstum des Primärtumors und eine erhöhte Metastaselast schließen lässt. Diese Vermutung konnte durch Endpunktanalysen bei eröffnetem Abdomen bestätigt werden. Demnach kann das erzeugte Tiermodell erfolgreich für die non-invasive Darstellung der MACC1-assoziierten Metastasierung verwendet werden. Dadurch steht ein aussagekräftiges und einfach anwendbares Modell zur Verfügung, um Interventionsstrategien hinsichtlich der MACC1-induzierten Metastasierung zu erforschen.

4.2 Bedeutung von MACC1 als metastasierungsinduzierendes Gen

MACC1 ist ein neuer molekularer Marker, der eine hohe prognostische Aussagekraft unabhängig von Geschlecht, Alter, Nodalstatus und anderen histopathologischen

Klassifikationen aufweist. Der Einfluss von MACC1 auf metastasierungsrelevante Parameter wurde bereits beschrieben. Wird MACC1 in Kolonkarzinomzellen überexprimiert, wird die Proliferation, Migration und Invasion gesteigert. Zusätzlich konnte in vivo bereits die metastasierungsinduzierende Wirkung von MACC1 in Mausmodellen bestätigt werden. Die Auswertung von Tumoren aus Kolonkarzinompatienten hinsichtlich der MACC1-Expression ergab, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten, deren Primärtumor MACC1 überexprimierte, signifikant reduziert war im Vergleich zu Patienten, deren Primärtumor MACC1 auf niedrigem Niveau exprimierte.⁸³

Nachdem die prognostische Relevanz und die metastasierungsinduzierende Wirkung von MACC1 in vorangehenden Arbeiten deutlich belegt werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit ein geeignetes In-vivo-Modell erzeugt werden, um die MACC1-induzierte Metastasierung vom kolorektalen Karzinom über einen konstanten Zeitraum zu beobachten. Durch dieses Mausmodell wird ermöglicht, effektive Interventionsstrategien gegen die MACC1-induzierte Metastasierung zu erforschen. So kann zukünftig der Einfluss von MACC1-Antikörpern und -Inhibitoren in einem geeigneten Modell validiert werden. Vor allem der Einsatz von siRNA und shRNA ist als therapeutischer Ansatz zur Bekämpfung der MACC1-induzierten Metastasierung hervorzuheben. Die Auswirkungen und Erfolge der erwähnten Therapieansätze können in dem vorliegenden Tiermodell einerseits durch Endpunktbestimmungen analysiert werden, andererseits können sie auch in Echtzeit über den gesamten Versuchsdurchlauf zu beliebigen Zeitpunkten beobachtet werden. Dies wird durch die stabile Emission eines Biolumineszenzsignals der MACC1-exprimierenden Tumorzellen gewährleistet. Das Echtzeit-Imaging erhöht die Menge und Qualität der daraus erhobenen Daten im Vergleich zu herkömmlichen Endpunktbestimmungen und soll zu einer Beschleunigung der Erforschung von Therapieansätzen gegen die MACC1-induzierte Metastasierung führen.⁹⁷ Dadurch soll der klinische Einsatz einer wirkungsvollen Metastasierungstherapie weiter vorangetrieben werden, denn die Ausbildung von Metastasen stellt bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit des kolorektalen Karzinoms den limitierenden Faktor dar.

Für ein geeignetes In-vivo-Modell war es wichtig ein Konstrukt zu erzeugen, welches sowohl das MACC1-Gen als auch das Reporter-gen Luciferase in einem gemeinsamen Vektor enthält. Als gemeinsamer Vektor wurde ein pIRES-Vektor ausgewählt und im

Anschluss der Erfolg der Klonierung durch Kontrollspaltungen und Sequenzierungen bestätigt. Die direkte Klonierung von MACC1 in den pIRES-Vektor gestaltete sich als schwierig, weshalb die Klonierung über den Zwischenvektor pCR 2.1 erfolgte.

Insgesamt wurden so drei verschiedene pIRES-Konstrukte erzeugt: Luciferase-IRES, Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 und Luciferase-IRES-MACC1. Alle drei erzeugten pIRES-Konstrukte wurden in die humane Kolonkarzinomzelllinie SW480 stabil transfiziert, da SW480-Zellen endogen MACC1 auf sehr niedrigem Niveau exprimieren. SW480-Zellen wurden aus einem rezidierten Primärtumor kultiviert, der zum Zeitpunkt der Resektion noch keine Metastasen aufwies. Eine Auswahl der Transfektanten wurde durch Analyse der Luciferaseaktivität und der MACC1-Transkription und -Translation getroffen. Im Anschluss wurden die ausgewählten Zellklone hinsichtlich metastasierungsrelevanter Parameter geprüft. Die In-vitro-Versuche wurden über mehrere Monate hinweg durchgeführt, wodurch eine stabile Expression von MACC1 und dem Reporter gen Luciferase gewährleistet werden konnte. Nach der In-vitro-Versuchsreihe wurden schließlich die stabilen Transfektanten in einem Xenograft-Mausmodell zur Überprüfung ihrer Metastasierungsfähigkeit eingesetzt.

4.3 pIRES Konstrukte exprimieren Luciferase und MACC1

Zur Überprüfung des Transfektionserfolges und der Selektion von Klonen wurden Expressionsanalysen für das Reporter gen Luciferase und für MACC1 durchgeführt.

Zum Nachweis der Luciferaseexpression wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Zum Nachweis der MACC1-Transkription und -Translation wurden quantitative real-time RT-PCRs und Western-Blots durchgeführt.

Die Klonierung eines Reporter gens in die generierten Konstrukte war essentiell für das In-vivo-Imaging. Dadurch, dass das Reporter gen und MACC1 in einen gemeinsamen pIRES-Vektor kloniert wurden, war es außerdem möglich, Rückschlüsse von der Reporter genexpression auf die MACC1-Expression zu ziehen. Als Vektor für ein Konstrukt, welches sowohl das Reporter gen Luciferase als auch MACC1 enthält, wurde pIRES ausgewählt. Durch die Klonierung in den pIRES-Vektor wurde sichergestellt, dass Zellen, die das Reporter gen exprimieren, auch zur Expression von MACC1 fähig sind. Wäre ein Fusionsproteinvektor zum Einsatz gekommen, wäre außerdem eine Beeinflussung zwischen dem Reporter gen und MACC1 möglich gewesen. Dadurch hätte es zu einer Änderung bzw. Beeinträchtigung der Funktionsweise sowohl der

Luciferase als auch von MACC1 kommen können. Des Weiteren konnte bereits durch Zumsteg et al. ein Tiermodell zur Analyse der Karzinogenese beim Pankreaskarzinom unter Verwendung eines pIRES-Vektors erfolgreich etabliert werden.⁹⁸ Als Reportergen kam dabei ebenfalls die Luciferase zum Einsatz, um die non-invasive Analyse des Rip1Tag2-Mausmodells zu ermöglichen.

Die Wahl der Luciferase als Reportergen lässt sich dadurch begründen, dass die Luciferase, verglichen mit anderen Reportergensystemen, hoch sensitiv und gut standardisiert ist und sowohl qualitative als auch quantitative Analysen der Genexpression erlaubt.⁹⁹ Die quantitative Analyse der Luciferaseexpression war für die vorliegende Arbeit mit dem Ziel, Transfektanten aller drei Versuchsgruppen zu erzeugen, die das Reportergen Luciferase in vergleichbarer Menge exprimieren, von besonderer Bedeutung. Es sollte erreicht werden, dass im In-vivo-Imaging unterschiedliche Signalintensitäten nicht durch unterschiedliche Reportergen-Expressionsraten begründet werden können. Aus diesem Grund wurden nach dem Luciferase-Assay nicht immer die Transfektanten ausgewählt, die das Reportergen am stärksten exprimieren, sondern jene, die im Reportergen-Assay mit den anderen Versuchsgruppen vergleichbare Werte erzielten und suffizient genug waren, um sie in vivo zu verwenden. Die Suffizienz für den In-vivo-Einsatz wurde durch Laborerfahrungen mit bisher durchgeführten Luciferase-basierten In-vivo-Imagings bewertet.

Die Luciferaseaktivität variierte bei den drei ausgewählten Transfektanten zwischen 40- und 78facher Steigerung verglichen mit der parentalen Zelllinie SW480. Die niedrigste Luciferaseaktivität erzielte hierbei der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1, die höchste Aktivität der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3. Alle Werte waren in Bezug auf die parentale Zelllinie SW480 statistisch signifikant (p-Wert < 0,001).

Messabweichungen durch die reflektierte Strahlung sind in verschiedenen Publikationen beschrieben.¹⁰⁰ Die Standardabweichung des Luciferase-Assays kann durch die Verwendung schwarzer Transwells gesenkt werden.¹⁰¹ In der vorliegenden Arbeit wurden durchsichtige Platten verwendet und das Protokoll wegen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht verändert. Zusätzlich dazu erfolgte zur Validierung der Ergebnisse die Bestimmung der Luciferaseaktivität aller drei erzeugten Zellklone über mehrere Monate.

Zum Nachweis der MACC1-mRNA-Expression konnten in dieser Arbeit der Einsatz der quantitativen real-time RT-PCR basierend auf Hybridisierungs sonden erfolgreich umgesetzt werden. Der Nachweis des PCR-Produktes erfolgte durch die Messung der Emission der fluorogenen Sonden.¹⁰² Die real-time PCR führte im Gegensatz zur konventionellen PCR keine Endpunktanalyse durch, sondern ermöglichte, das PCR-Produkt während der linearen Amplifikationsphase zu detektieren und mittels einer Software zu quantifizieren.¹⁰³ Für die Quantifizierung des Amplifikats gab es die Möglichkeit zur absoluten oder relativen Bestimmung. In dem vorliegenden Projekt erfolgte die Quantifizierung relativ in Bezug auf das Housekeeping-Gen G6PDH. Der Vorteil der relativen Quantifizierung ist, dass cDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben in Bezug auf das Housekeeping-Gen normalisiert werden können.¹⁰⁴ Die Angabe der mRNA-Amplifikation erfolgte daher als Ratio und nicht wie bei der absoluten Quantifizierung in absoluten Zahlen.

Die Frage nach der Normierung auf ein Housekeeping-Gen ist derzeit umstritten, da einige Arbeitsgruppen auf die Rolle der Housekeeping-Gene in verschiedenen Zellstoffwechselfvorgängen hinweisen und sie dadurch als ungeeigneten Normierungsparameter ansehen. Im praktischen Alltag jedoch wird von einem Großteil der Arbeitsgruppen der Einsatz von Housekeeping-Genen als zulässig erachtet.¹⁰⁵ Im Rahmen dieses Projektes wurde die Messung der mRNA-Amplifikation außerdem innerhalb derselben Zelllinie vorgenommen, wodurch die Zellstoffwechselfvorgänge keine gravierenden Unterschiede aufweisen sollten.

In der relativen Quantifizierung mittels real-time RT-PCR erzielte der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 eine 303fache Expressionssteigerung von MACC1 bezogen auf die parentale Zelllinie SW480. Der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 erreichte eine 142fache Expressionssteigerung, die als zufriedenstellend bewertet werden kann, jedoch nur ca. die Hälfte der Expressions-Ratio der Versuchsgruppe mit mutiertem MACC1 darstellt. Diese unterschiedlichen Expressionsraten spiegeln sich auch in dem zuvor erwähnten Luciferase-Assay wider, bei dem die Luciferaseaktivität in der Gruppe mit mutiertem MACC1 (78fach) doppelt so hoch war wie in der Gruppe mit MACC1 vom Wildtyp (40fach). Diese Daten legen nahe, dass die Menge des exprimierten Reportergens Luciferase auf die Menge des MACC1-Gens schließen lässt, da beide gemeinsam in den pIRES-Vektor kloniert wurden.

Die Steigerung der MACC1-Expression in den stabilen Transfektanten im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 erreicht vergleichbare Ergebnisse zu bisherigen

Publikationen der Arbeitsgruppe und kann dadurch als zufriedenstellend betrachtet werden. Zum Vergleich wurden in vorhergehenden Arbeiten nach Transfektion von MACC1 vom Wildtyp im Vektor pcDNA 3.1 120fache Expressionssteigerungen bezogen auf die parentale Zelllinie SW480 erzielt.⁸³ Neben der Zelllinie SW480, die aus einem rezidierten Primärtumor kultiviert wurde, existiert ausgehend vom selben Patienten noch die Zelllinie SW620. Die Zelllinie SW620 wurde dem Patienten zu einem späteren Zeitpunkt aus einer Lymphknotenmetastase entnommen. Im Vergleich zu der Zelllinie SW480 weist die Zelllinie SW620 eine 300fach gesteigerte MACC1-Expressionrate auf und zeigte in bisherigen Arbeiten ein signifikant gesteigertes metastatisches Potential bezogen auf metastasierungsrelevante Parameter wie Proliferation, Migration und Invasion. Gleiches galt auch für die pcDNA-3.1-Transfektanten mit einer 120fach gesteigerten MACC1-Expression.⁸⁸ In Kenntnis dieser Werte aus zurückliegenden Arbeiten konnte demnach eine 142fache MACC1-Expressionsteigerung in der vorliegenden Arbeit als suffizient betrachtet werden, um metastatische Parameter sowohl in vitro als auch in vivo zu steigern.

Die Darstellung der MACC1-Proteinexpression mittels Western Blot weist für die beiden Transfektanten mit mutiertem MACC1 und mit MACC1 vom Wildtyp eine Proteinbande bei 97 kDa bzw. 91 kDa nach. Der Größenunterschied, der in dem dargestellten Western Blot zu erkennen ist, beruht auf der Deletion der SH3-Domäne bei dem mutierten MACC1. Der Transfektant mit mutiertem MACC1 weist eine ähnlich starke Proteinbande auf wie der Transfektant mit MACC1 vom Wildtyp. Dem Reporteragen-Assay und der MACC1-mRNA-Expression zufolge müsste jedoch der Transfektant mit dem mutierten MACC1 erwartungsgemäß auch eine stärkere Bande haben als der Transfektant mit MACC1 vom Wildtyp. Die Ladekontrolle mit β -Tubulin bestätigt, dass für beide Transfektanten dieselbe Proteinmenge aufgetragen wurde. Es scheint also, dass die Translation für mutiertes MACC1 gestört ist oder dass durch die Deletion der SH3-Domäne die Kinetik des MACC1-Proteins verändert wird und infolgedessen die Stabilität abnimmt. Die Instabilität von Proteinen durch Mutationen ist weitreichend bekannt und kann durch verschiedene Veränderungen in der Proteinkinetik hervorgerufen werden.¹⁰⁶ Die veränderte Kinetik könnte dazu führen, dass mutiertes MACC1 schneller abgebaut wird als MACC1 vom Wildtyp. Durch die höhere MACC1-mRNA-Expression in dem Transfektanten mit mutiertem MACC1 wird allerdings der

Effekt der Proteininstabilität ausgeglichen. Folglich scheint im Western Blot die MACC1-Proteinmenge bei beiden MACC1-Transfektanten auf gleichem Niveau zu liegen.

4.4 MACC1 steigert migratorisches und invasives Potential

Die Motilität von Krebszellen ist ein entscheidender metastatischer Parameter. Das migratorische und invasive Potential von metastasierenden Zellen muss gesteigert sein, damit die einzelnen Zwischenschritte der Metastasierung erreicht werden können (Invasion des Kapillarbett, Extravasation, Verdau der ECM). Durch Migrations- und Invasions-Assays kann die Motilität von Zellen analysiert werden und somit eine Bewertung des metastatischen Potentials erfolgen. Sie ersetzen allerdings nicht das Tiermodell, dessen Durchführung meist unerlässlich ist. Die In-vitro-Assays sind jedoch sehr gute Voruntersuchungen und dienen dazu, unnötige Tierversuche zu vermeiden, was aus ethischen und finanziellen Gesichtspunkten von großer Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der durchgeführten Migrations- und Invasions-Assays wurden basierend auf bisherigen Projekten mit MACC1 in der Arbeitsgruppe verglichen und zeigen eine deutliche Korrelation mit diesen. MACC1 wurde bei früheren Projekten in einem pcDNA-3.1-Konstrukt in SW480-Zellen transfiziert und führte dort zu einer gesteigerten Migration und Invasion.⁸³ Da in diesem Projekt ein vollkommen neues Konstrukt zum Einsatz kam, welches das Reportergen Luciferase und MACC1 in einem gemeinsamen pIRES-Vektor enthält, wurden für die erzeugten Klone die Motilitäts-Assays erneut durchgeführt und die Ergebnisse in Bezug auf die früheren Daten bewertet, um so über den Einsatz im Mausmodell zu entscheiden. Dadurch sollte die Effektivität der Ko-Transfektion unter Verwendung des pIRES-Vektors und die korrekte biologische Aktivität der Transgene sichergestellt werden.

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Migrations-Assays zeigten, dass nur der Zellklon, der MACC1 vom Wildtyp exprimiert, ein gesteigertes migratorisches Potential aufwies. Verglichen mit der parental Zelle SW480 migrierten 5mal so viele Zellen durch die Poren des Transwells. Die Migration der beiden anderen Klone mit dem Kontrollkonstrukt und mit mutiertem MACC1 war hingegen nicht signifikant erhöht (1,4fach bzw. 1,6fach).

Zum Vergleich erzielten in früheren Projekten mit MACC1 transfizierte SW480-Zellen eine 4fach gesteigerte Migration im Vergleich zu den parental Zellen. SW620-Zellen,

die intrinsisch sehr viel MACC1 exprimieren, erreichten in Bezug zu SW480-Zellen ein 7fach gesteigertes migratorisches Potential.⁸³

Die Ergebnisse der im vorliegenden Projekt erzeugten Zellklone mit den pIRES-Konstrukten konnten demnach als zufriedenstellend bewertet werden. Es wurde gezeigt, dass weder der pIRES-Vektor noch das Reporter-gen Luciferase Einfluss auf das migratorische Verhalten ausüben. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der SH3-Domäne funktionell analysiert.

Für die Untersuchung eines weiteren entscheidenden Parameters der Metastasierung wurden Invasions-Assays mit den stabilen Transfektanten vorgenommen. Die Ergebnisse der Invasions-Assays korrelieren mit denen der Migrations-Assays. Es bestätigt sich, dass nur der Transfektant, der MACC1 vom Wildtyp überexprimiert, ein gesteigertes invasives Potential aufweist. Verglichen mit parentalen SW480-Zellen zeigten Zellen mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 ein 3,7fach gesteigertes invasives Potential. Die Invasionsrate der Transfektanten mit den Konstrukten Luciferase-IRES bzw. Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3 war hingegen nicht erhöht (0,8fach bzw. 0,2fach).

Ein ähnlicher Anstieg der Invasionsrate wurde auch bei früheren Projekten in der Arbeitsgruppe beobachtet, bei denen andere Expressionsvektoren für die MACC1-Klonierung benutzt wurden. Zum Vergleich wurde bei stabil transfizierten SW480-Zellen, die MACC1 überexprimieren, eine 3,5fache Steigerung der Invasionsrate erzielt.⁸³ Die Invasionsrate von SW620-Zellen ist im Vergleich zu SW480-Zellen 7fach erhöht.⁸³

Somit konnten die Ergebnisse der Migrations-Assays durch die Invasions-Assays bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Motilität in dem Transfektant mit Wildtyp-MACC1 im Vergleich zur parentalen Zelllinie SW480 signifikant gesteigert werden konnte (p-Wert < 0,05). Außerdem wurde sowohl das migratorische als auch das invasive Potential durch die Verwendung des pIRES-Expressionsvektors im stärkeren Maße erhöht, als es in früheren Projekten mit dem pcDNA-3.1-Expressionsvektor gelungen ist. Verglichen mit SW620-Zellen, die einer Lymphknotenmetastase entstammen, erzielte der Transfektant mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 jedoch nur halb so hohe Werte. Dies korreliert auch mit der MACC1-mRNA-Expressionsrate, denn SW620-Zellen exprimieren doppelt so viel MACC1 wie der

Transfektant mit dem Wildtyp-MACC1-Konstrukt (SW620 = 300fach, SW480 + Luciferase-IRES-MACC1 = 142fach verglichen zu den parental SW480-Zellen).⁸³

Die Ergebnisse der In-vitro-Voruntersuchungen zeigten, dass alle erzeugten Zellklone das Reporter-gen Luciferase auf einem suffizienten Niveau exprimieren, um die Zellen in vivo über das emittierte Biolumineszenzsignal zu beobachten. Die MACC1-Expression der erzeugten stabilen Transfektanten erzielte ein höheres Niveau, als in vorhergehenden Projekten unter Verwendung anderer Expressionsvektoren. Die Motilitätsanalysen ergaben, dass die Funktion von MACC1 nicht beeinträchtigt wird. Dies führte zu dem Schluss, dass die gemeinsame Klonierung mit dem Reporter-gen in den pIRES-Vektor keine erkennbaren Auswirkungen hat. Die Ergebnisse der Motilitäts-Assays waren bezogen auf den Klon mit MACC1 alle signifikant und korrelierten mit den Ergebnissen früherer Projekte. Durch Endpunktbestimmungen in zurückliegenden Arbeiten wurde die metastasierungsinduzierende Eigenschaft von MACC1-überexprimierenden Zellen bereits bestätigt. Die MACC1-Expression war damals mit denen im Rahmen dieser Arbeit generierten Transfektanten vergleichbar. Sowohl die Luciferase- als auch die MACC1-Aktivität wurde demzufolge nach Abschluss der In-vitro-Voruntersuchungen als suffizient bewertet, um den Einsatz im Tier zu gewährleisten und wird gestützt durch die bereits veröffentlichten Endpunktbestimmungen der MACC1-induzierten Metastasierung.

4.5 Biolumineszenz-Signal ist suffizient für das non-invasive Imaging

Die suffiziente Emission eines Biolumineszenzsignals ausgehend von den stabil transfizierten Tumorzellen war die Grundlage für die erfolgreiche Durchführung der In-vivo-Versuchsstrecke im Rahmen dieses Projektes. Die Luciferaseaktivität der einzelnen Zellklone konnte zwar in den zuvor durchgeführten In-vitro-Versuchsstrecken analysiert werden und die Ergebnisse wurden als zufriedenstellend bewertet, jedoch stellt der Einsatz in einem lebenden Organismus viel komplexere Anforderungen dar, die Auswirkungen auf die Qualität des Biolumineszenzsignals haben können und dessen Quantifizierung erschweren. Es ist zum Beispiel zu Bedenken, dass in einem lebenden Organismus das Biolumineszenzsignal durch verschiedene Organstrukturen unterschiedlich absorbiert werden kann. Vor allem Licht mit einem Farbspektrum im grünen oder blauen Bereich wird in starkem Maße durch das Hämoglobin der

Erythrozyten absorbiert, wodurch die Lichtemission in diesem Spektrum reduziert wird. Dieses Problem wird jedoch durch das breite Farbspektrum der Luciferase abgeschwächt und so ist es vor allem das Licht im roten Wellenbereich, welches vergleichsweise gut tiefe Gewebeschichten durchdringen kann und somit das nicht invasive Imaging gewährleistet. Nicht zuletzt aufgrund dieser positiven Eigenschaft ist die Luciferase das meistgenutzte Reportergen für den In-vivo-Einsatz.¹⁰⁷ Ein weiterer Vorteil der Luciferase als Reportergen für die Detektion von onkologischen Prozessen ist das proportionale Verhalten des Biolumineszenzsignals zur Tumorlast und die Tatsache, dass bereits makroskopisch nicht erkennbare Metastasen durch das Biolumineszenzsignal sichtbar werden.^{108 109} Wegen des proportionalen Verhaltens zur Tumorlast ist der Einsatz der Luciferase in der Erforschung neuer Krebstherapien von großer Bedeutung, denn durch die Luciferase gelingt der direkte Nachweis von Veränderungen des Tumorwachstums und des Metastaseverhaltens durch Chemotherapeutika oder molekularbiologische Ansätze.^{110 111 112 113 114} Neben der Transfektion in Tumorzellen wurden unter anderem durch Carlsen et al. funktionelle Analysen bestimmter Transgene durch Kotransfektion mit dem Reportergen Luciferase durchgeführt. Dadurch gelang es, ein besseres Verständnis für die Mechanismen zu erlangen, durch die die jeweiligen Transgene das Fortschreiten von Krankheiten fördern.^{115 116 117} In dem vorliegenden Projekt wurde die Luciferase nicht nur zum Imaging der kolorektalen Karzinogenese erfolgreich eingesetzt, sondern durch die Transfektion zusammen mit MACC1 in einem gemeinsamen Vektor konnte ebenfalls die Funktion von MACC1 in vivo evaluiert werden.

Das emittierte Biolumineszenzsignal der Luciferase gewährleistet außerdem ein Imaging der Karzinogenese in Echtzeit. Dies bietet verschiedene Vorteile im Vergleich zu den herkömmlichen Endpunktbestimmungen. So ist es möglich, in einem Tumormodell einen Therapieansatz bei einem Tier über die gesamte Therapiezeit zu verfolgen. Durch das konstante nicht invasive Imaging kann die Versuchsdurchführung flexibler erfolgen, indem die Therapeutikagabe beispielsweise abhängig von der Tumorprogression erfolgt oder die Auswirkungen von Therapiepausen während der Behandlung in einem Versuchstier analysiert werden.¹⁰¹ Das wiederholte In-vivo-Imaging im selben Versuchstier während der Therapeutikagabe und während definierter Therapiepausen ist eine der grundlegendsten Herausforderungen in der Erforschung neuer Medikamente im Bereich der Onkologie.¹¹⁸ Durch die Analyse in Echtzeit durch

das Biolumineszenz-Imaging wird dies gewährleistet. Ein weiterer Vorteil dieser Datenerhebung in Echtzeit ist der höhere Informationsgehalt der Biolumineszenzaufnahmen im Vergleich zu den Endpunktanalysen. So gelingt bereits der Nachweis von makroskopisch nicht sichtbaren Mikrometastasen und durch die Ganzkörperaufnahmen ist die Auswertung der Karzinogenese nicht auf die Histologie einzelner Organkompartimente beschränkt, sondern erfasst den gesamten Organismus. In Konsequenz dazu kann die Anzahl der benötigten Versuchstiere deutlich reduziert werden.¹⁰¹ Dies vereinfacht in der Forschung die Versuchsdurchführung und ist ebenfalls sowohl aus ethischen als auch aus finanziellen Gründen von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieses Projektes konnten Zellverbände, die das Reporter-gen Luciferase exprimieren, durch Messung der umgesetzten Menge an Photonen mit Hilfe einer hoch sensitiven CCD-Kamera erfolgreich beobachtet werden. Dadurch war es möglich, Rückschlüsse hinsichtlich der Metastasierungsrate und der Proliferation des Primärtumors zu ziehen. Die Ganzkörper-Biolumineszenzaufnahmen ermöglichten es außerdem, alle metastaserelevanten Organkompartimente in das Imaging mit einzubeziehen. In der vorliegenden Arbeit waren die Milz als Sitz des Primärtumors und die Leber als präferiertes Organ für die distante Metastasierung von Bedeutung. Für die Standardisierung der erstellten Biolumineszenzaufnahmen war die korrekte intrasplenale Injektion von entscheidender Bedeutung, aber auch die immer gleich bleibende Positionierung der Versuchstiere unter der CCD-Kamera.¹¹⁹ Um eine korrekte Injektion in die Milz zu gewährleisten, wurde das Organ durch einen 1 cm langen Schnitt freigelegt und dann eine definierte Menge an stabil transfizierten Tumorzellen, gelöst in einer gleich bleibenden Menge an sterilem PBS, intrasplenal injiziert.

Einen weiteren Einfluss auf die Bildqualität hat die gleichmäßige intraperitoneale Verteilung des injizierten Luciferins, da das Substrat durch Diffusion in den intraperitoneal gelegenen Tumormassen angereichert wird. Neben dieser direkten Diffusion gelangt das Substrat jedoch auch über das Bauchfell in den Blutkreislauf und kann so über die Gefäßversorgung in die Tumoreale gelangen. Inwieweit die Substratanreicherung über den Blutkreislauf erfolgt, ist stark abhängig von der Vaskularisierung des Tumors. Tumormassen mit ausgeprägter Vaskularisierung haben eine stärkere Substratanflutung als schlecht vaskularisierte Tumore.¹¹⁹ Zentrale

nekrotische Anteile eines Tumors würden ebenfalls nicht durch ein Biolumineszenzsignal detektierbar sein. Zentrale nekrotische Areale stellten bei anderen Publikationen, die ebenfalls Tumormodelle mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt haben, Probleme dar, die zu einem Informationsverlust in den erstellten Biolumineszenzaufnahmen geführt haben.¹²⁰ In dem vorliegenden Projekt traten keine erkennbaren nekrotischen Herde auf, wodurch auch die zentralen Tumoranteile ein stabiles Biolumineszenzsignal aufwiesen.

Auffällig war bei den drei untersuchten Versuchsgruppen, dass die Versuchstiere mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 von Beginn des Imagings an ein deutlich stärkeres Biolumineszenzsignal emittierten als die Versuchstiere der beiden anderen Gruppen. Da sowohl die intrasplenale Injektion der stabil transfizierten Tumorzellen als auch die intraperitoneale Substratapplikation sowie die Positionierung der Versuchstiere unter der CCD-Kamera für alle Gruppen gleichbleibend und standardisiert erfolgte, können diese als Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Diese würden ohnehin eher interindividuelle Variationen erklären und nicht Unterschiede, die eine gesamte Versuchsgruppe betreffen. Eine weitere Vermutung wäre der Verlust des Transgens durch den fehlenden Selektionsdruck *in vivo*. Während die *In-vitro*-Voruntersuchungen der drei Klone unter ständiger Zugabe von G418 erfolgten, musste darauf im lebenden Organismus verzichtet werden. Durch Jenkins et al. konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression der Luciferase selbst nach 24-wöchiger *In-vivo*-Passage nicht reduziert wird. Die Emission der Biolumineszenz war nach Rekultivierung der Tumorzellen in nachfolgenden *In-vitro*-Assays sogar leicht erhöht.¹²⁰ Dies lässt darauf schließen, dass auch in dem vorliegenden Tumormodell kein Verlust des Transgens erfolgt ist. Es ist daher nahe liegend, dass in der Versuchsgruppe mit MACC1 die applizierten Tumorzellen besser angewachsen sind und daher in der Lage waren, in stärkerem Maße ein Biolumineszenzsignal zu emittieren als bei den anderen beiden Versuchsgruppen, da MACC1 auch die Proliferationsrate erhöht.⁸³ Jenkins et al. zeigten außerdem, dass das Biolumineszenzsignal während der ersten Woche nach Applikation von stabil transfizierten Tumorzellen um den Faktor 10 reduziert wird, bevor es wieder ansteigt, da nicht alle Tumorzellen anwachsen.¹¹¹ MACC1 scheint also das Anwachsen der Tumorzellen nach Injektion zu erleichtern, was das stärkere Biolumineszenzsignal in der Versuchsgruppe Luciferase-IRES-MACC1 schon von Beginn des Imagings an begründen würde.

Neben der Detektion eines stabilen Biolumineszenzsignals in vivo bei allen Versuchsgruppen, konnte dieses Verfahren außerdem erfolgreich ex vivo angewendet werden. Damit gelang es, die einzelnen Organe differenziert zu betrachten und sowohl das erfolgreiche Anwachsen des Primärtumors als auch das Vorkommen von Metastasen zu verifizieren. Bei einigen Versuchstieren waren während der In-vivo-Aufnahmen keine Metastasen detektierbar und auch makroskopisch konnte teilweise nicht auf Metastasen geschlossen werden. Die Ex-vivo-Aufnahmen boten eine höhere Sensitivität und stellten daher eine sinnvolle Ergänzung zu den Echtzeitaufnahmen im lebenden Organismus dar.

Wegen der hohen Sensitivität dieses Messverfahrens mittels einer CCD-Kamera müssen die Messbedingungen durch ein Versuchsprotokoll standardisiert und so präzise wie möglich durchgeführt werden. Über den Zeitraum des gesamten Imagings im Rahmen dieses Projekt wurde das Protokoll gleichbleibend ausgeführt und dadurch die Validität der erstellten Aufnahmen gewährleistet.

4.6 MACC1 führt zu einem gesteigerten Wachstum des Primärtumors

In Anlehnung an Ergebnisse aus früheren Arbeiten, die eine klare Korrelation zwischen der MACC1-Expression und der proliferativen Eigenschaften sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen haben, wurde auch bei dem vorliegenden Projekt davon ausgegangen, dass die Tumorzellen, die MACC1 vom Wildtyp überexprimieren, im Tiermodell in stärkerem Maße proliferieren als die beiden anderen Versuchsgruppen.⁸³ Eine stärkere Proliferation sollte durch das Biolumineszenz-Imaging sowohl in vivo als auch bestätigend ex vivo nachgewiesen werden, da die Stärke des Biolumineszenzsignals proportional zur Tumorlast ist.¹⁰⁸ In früheren Arbeiten war zu beobachten, dass das Tumorwachstum mit orthotop transplantierten Tumorzellen, die MACC1 überexprimieren, mehr als dreimal so hoch war wie von Tumorzellen, die kein MACC1 exprimieren.⁸³ Dieses vermehrte Wachstum des Primärtumors durch die Steigerung der Proliferation bei MACC1-Überexpression wurde auch in dem vorliegenden Projekt beobachtet.

Es konnte erfolgreich bei jedem Versuchstier die intrasplenale Injektion von Tumorzellen durchgeführt werden. Dies wird durch die Aufnahmen der einzeln präparierten Organe des abschließenden Versuchstages bestätigt. Bei diesen Ex-vivo-Aufnahmen ist in der Milz jedes Versuchstieres ein Signalfokus ausgehend von dem

Primärtumor zu erkennen. Die Ausprägung der Signalintensität weist zwischen den Versuchsgruppen Unterschiede auf. In der Versuchsgruppe mit dem Kontrollkonstrukt (Luciferase-IRES) und in der Versuchsgruppe mit dem mutierten MACC1 (Luciferase-IRES-MACC1 Δ SH3) ist das von der Milz ausgehende Biolumineszenzsignal in den abschließenden Aufnahmen deutlich geringer als in der Versuchsgruppe mit MACC1 vom Wildtyp (Luciferase-IRES-MACC1). Demnach ist zu erkennen, dass das Wachstum des Primärtumors durch die Expression von MACC1 vom Wildtyp deutlich gesteigert ist.

4.7 MACC1 erhöht die Metastaselast

Durch das In-vivo-Imaging sollte nicht nur der Einfluss von MACC1 auf die proliferativen Eigenschaften untersucht werden, sondern auch auf das metastatische Potential. Die In-vitro-Voruntersuchungen zeigten bereits eine klare Korrelation zwischen der MACC1-Expression und den migratorischen und invasiven Eigenschaften in den stabilen Transfektanten mit den pIRES-Konstrukten. Migration und Invasion sind bedeutende Parameter für die Metastasierung.

Die Ergebnisse des im Rahmen dieses Projektes durchgeführten In-vivo-Imagings zeigen neben einem erhöhten Tumolvolumen an der Milz durch MACC1 vom Wildtyp außerdem eine deutlich erhöhte Metastasierungsrate in der Versuchsgruppe Luciferase-IRES-MACC1. Das betreffende Zielorgan für die Metastasierung war die Leber. Durch die Ganzkörperaufnahmen standen auch andere Organsysteme wie Lunge und Gehirn unter kontinuierlicher Kontrolle, jedoch waren die Biolumineszenzsignale neben der Milz als Sitz des Primärtumors immer hepatisch lokalisiert. Auffällig war das sehr frühe Anwachsen von Metastasen in dem durchgeführten Imaging. Die meisten Versuchstiere, bei denen in den Ex-vivo-Aufnahmen Metastasen in der Leber verifiziert werden konnten, wiesen schon an den ersten Aufnahmetagen Signalherde auf, die auf eine hepatische Lokalisation schließen ließen. Durch Timpson et al. wurde bereits davon berichtet, dass die intrasplenale Injektion von Tumorzellen sehr zeitnah zur Absiedlung von einzelnen Zellen in distante Zielorgane führt. In den Zielorganen angekommen, können diese Zellen jedoch nicht überleben, wenn sie zu den einzelnen Zwischenschritten der Metastasierung (Invasion, Proliferation, Angiogenese) nicht fähig sind. In dieser erwähnten Publikation wurden interessanterweise SW620-Zellen verwendet, die wie beschrieben MACC1 intrinsisch auf sehr hohem Niveau exprimieren. Darüber hinaus wurden die Zellen gleichfalls

intrasplenal injiziert. Der Nachweis von abgesiedelten Tumorzellen gelang nach mikroskopischer Analyse bereits 30 min nach intrasplener Injektion.¹²¹

Vor allem die Versuchsgruppe mit MACC1 vom Wildtyp wies eine deutlich erhöhte Metastaserate auf, die bereits an den ersten Tagen des Imagings erkennbar war. Dies belegt, dass die Metastasierung im Rahmen dieses Projektes ebenfalls sehr zeitnah nach intrasplener Injektion erfolgte und dass durch die Expression von MACC1 das Anwachsen von kolorektalen Tumorzellen in der Leber gesteigert wurde.

Bei vorhandener Metastasierung erschien außerdem das Biolumineszenzsignal in der Leber ausgehend von dem metastatischen Gewebe in der Versuchsgruppe mit MACC1 vom Wildtyp am stärksten und die Anzahl der Metastasen pro Leber lag ebenfalls auf einem deutlich höheren Niveau. Traten Metastasen in der Versuchsgruppe mit dem Kontrollkonstrukt oder mit mutiertem MACC1 auf, so waren diese randständig an der Leber lokalisiert und bei MACC1 vom Wildtyp waren sie eher zentral gelegen. Außerdem konnte die Metastaserate durch die Deletion der SH3-Domäne reduziert werden. Dies spricht für den bedeutenden Einfluss der SH3-Domäne auf die Funktion von MACC1 und unterstützt die Hypothese, dass die MACC1-induzierte Metastasierung über Protein-Protein-Interaktion des Moleküls in Signaltransduktionskaskaden vermittelt wird.

Die Ergebnisse dieses Imagings korrelieren mit anderen Tiermodellen aus der Arbeitsgruppe. Neben dem erhöhten Tumolvolumen durch die proliferativen Eigenschaften von MACC1 konnte in vorhergehenden Projekten ebenfalls die Metastasierungsrate durch Expression von MACC1 signifikant erhöht werden.⁸³ In einer früheren Arbeit wurde die kolorektale Karzinomzelllinie LS174T verwendet. LS174T-Zellen haben intrinsisch ein höheres metastatisches Potential als SW480-Zellen. Nach intrasplener Injektion mit LS174T-Zellen, die mit MACC1 transfiziert wurden, kam es zum Auftreten von makroskopisch gut sichtbaren hepatischen Metastasen, wie mittels Endpunktbestimmungen gezeigt werden konnte.

Durch die Ergebnisse dieses In-vivo-Imagings konnte die in vitro nachgewiesene Rolle von MACC1 als Induktor der Migration und Invasion bestätigt werden. Die Verwendung des Reportergens Luciferase in einem gemeinsamen Konstrukt mit MACC1 eröffnet außerdem die neue Möglichkeit der räumlichen und zeitlichen Nachverfolgung

transplantierte Tumorzellen auf nicht invasivem Weg und gibt Aufschlüsse über die MACC1-induzierte Metastasierung beim kolorektalen Karzinom.

Die im Rahmen dieses Projektes erzeugten Konstrukte stellen durch die Ko-Transfektion des Reportergens Luciferase und von MACC1 eine echte Innovation in Hinblick auf das non-invasive Imaging der MACC1-induzierten Metastasierung dar. Im Anschluss an diese Arbeit wurde mit den erzeugten Konstrukten in der Arbeitsgruppe Stein weitergearbeitet, um in Anlehnung an dieses Projekt eine effiziente Inhibition der MACC1-Expression zu erzielen. Es erfolgte dabei die Analyse des Einflusses von shRNA auf MACC1 mittels non-invasivem Biolumineszenz-Imagings. Die verwendete MACC1-shRNA wurde in früheren Projekten der Arbeitsgruppe generiert und zeigte in diesen bereits eine Reduktion der metastasierungs-relevanten Parameter in vitro und eine Reduktion der Tumorprogression in vivo, was jedoch nur über Endpunktbestimmungen ausgewertet wurde. Die Ergebnisse der aktuellen In-vitro-Versuchsreihe (durchgeführt von Janice Smith) und des In-vivo-Imagings über einen konstanten Zeitraum mit anschließenden Endpunktbestimmungen (durchgeführt von Dennis Kobelt und Ulrike Sack) sind vielversprechend. Es konnte gezeigt werden, dass MACC1-shRNA in der Lage ist, eine Reduktion der Metastaselast zu erzielen und es wurde bewiesen, dass das in diesem Projekt erzeugte Tiermodell auf der Basis der Expression zweier Transgene in einem gemeinsamen IRES-Vektor suffizient ist, um effektive Interventionsstrategien gegen die MACC1-induzierte Metastasierung zu untersuchen. Neben der Analyse des therapeutischen Nutzens von MACC1-shRNA bieten sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten für dieses Tiermodell an wie die Evaluation von MACC1-Antikörpern oder -Inhibitoren. In Abb. 4.1 ist exemplarisch jeweils ein Versuchstier der drei Gruppen dargestellt.

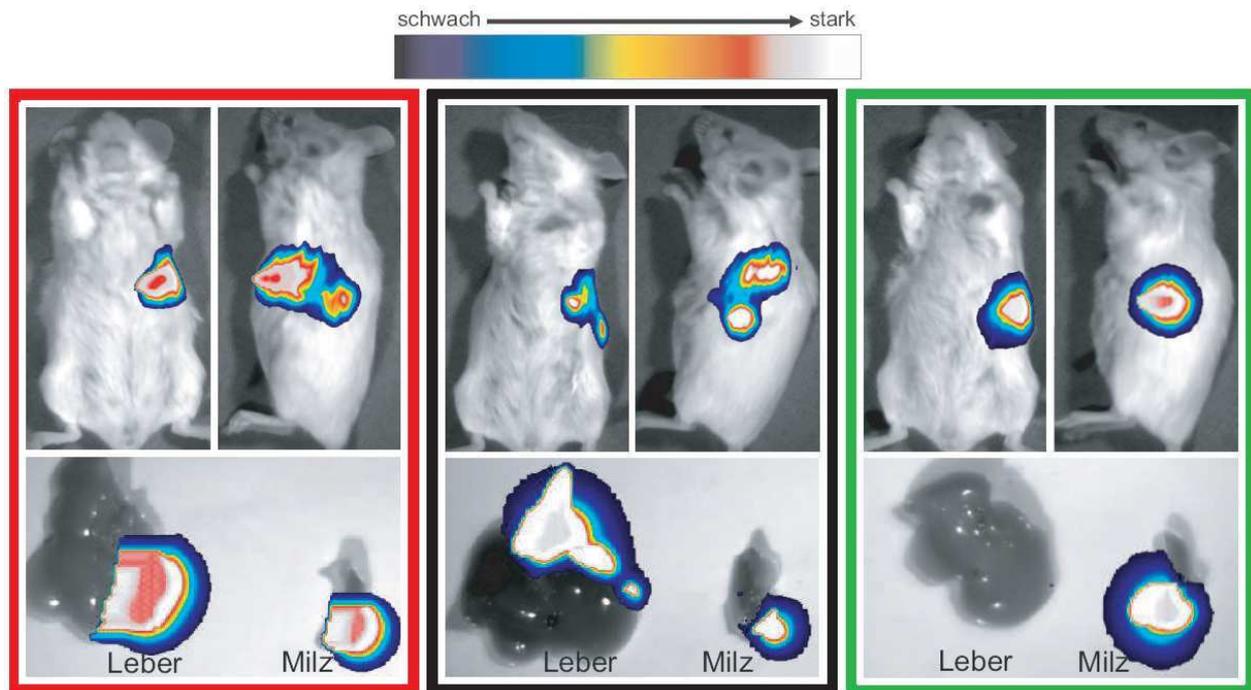


Abb. 4.1: MACC1-shRNA reduziert die Metastaselast. Dargestellt ist jeweils ein Versuchstier, welches beispielhaft für die gesamte Gruppe ausgewählt wurde. Die Versuchsgruppe mit Luciferase-IRES-MACC1 [rot] weist sowohl ein Biolumineszenzsignal von der Milz ausgehend auf als auch von der Leber. Dies lässt auf ein erfolgreiches Anwachsen des intrasplenalen Primärtumors als auch auf dessen Metastasierung schließen.

Bei der nächsten Versuchsgruppe wurden die Transfektanten der Gruppe Luciferase-IRES-MACC1 mit Kontroll-shRNA kotransfiziert [schwarz]. Auch hier ist ein Biolumineszenzsignal von der Leber ausgehend sichtbar, weshalb von hepatischen Metastaseherden ausgegangen werden kann.

Bei der dritten Gruppe wurden die Transfektanten mit dem Konstrukt Luciferase-IRES-MACC1 zusätzlich mit MACC1-shRNA kotransfiziert [grün]. Dadurch sollte der Einfluss von MACC1 auf die Karzinogenese inhibiert werden. Es ist zu erkennen, dass auch in dieser Versuchsgruppe der Primärtumor intrasplenal angewachsen ist, jedoch besteht im Unterschied zu den anderen Versuchsgruppen kein Anhalt auf eine hepatische Metastasierung.

4.8 Ausblick

Anhand dieses Projektes wurde die Bedeutung von MACC1 als zentraler Regulator der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom bestätigt und es wurde der Einfluss der SH3-Domäne auf die Funktion von MACC1 verdeutlicht. Durch die Generierung eines Konstruktes, was sowohl MACC1 als auch das Reporter-gen Luciferase in einem gemeinsamen pIRES-Vektor enthält, konnte in einem Mausmodell die zeitliche und räumliche Darstellung der MACC1-induzierten Tumorprogression und Metastasierung ermöglicht werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass von der Luciferaseexpression Rückschlüsse auf die MACC1-Expression in den stabilen Transfektanten gezogen werden können.

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung stellt MACC1 ein wichtiges Angriffsziel für eine wirkungsvolle Therapie des kolorektalen Karzinoms dar. Mit dem Ziel der Inhibition von Tumorprogression und Metastasierung könnte ein Durchbruch in der molekularen Krebstherapie mit Hilfe von MACC1-spezifischen Interventionsstrategien gelingen. Vorstellbar sind dabei MACC1-Inhibitoren und MACC1-Antikörper. Es sollte daher die Suche nach effizienten Inhibitoren und die Prüfung von MACC1-Antikörpern Bestandteil intensiver Forschung sein und letztendlich die Frage der klinischen Anwendung im Vordergrund stehen, weshalb vor allem die erfolgreiche Anwendung im In-vivo-Modell eine wichtige Grundvoraussetzung ist.

Das im Rahmen dieses Projektes generierte Mausmodell erfüllt diese Voraussetzung. Es ermöglicht schnellere und genauere Analysen potentieller Therapien und macht die Versuchsdurchführung mit Therapeutika flexibler. Dies führt zusätzlich zu einer Reduktion der benötigten Versuchstiere.

Neben möglichen MACC1-Inhibitoren und -Antikörpern ist auch der Einsatz von MACC1-shRNA vorstellbar. Da mit den in diesem Projekt erzeugten Konstrukten bereits weitergearbeitet wurde, konnte bereits eine Hemmung der MACC1-induzierten Metastasierung durch den Einsatz von MACC1-shRNA gezeigt werden. Dies wurde auf non-invasivem Weg mittels Biolumineszenz-Imaging über einen konstanten Zeitraum beobachtet und zusätzlich durch die in Abb.: 4.1 dargestellten Endpunktbestimmungen belegt. Die Ergebnisse zeigen einen therapeutischen Nutzen durch den Einsatz von MACC1-shRNA und machen eine ähnliche Anwendung in Bezug auf MACC1-Inhibitoren und MACC1-Antikörper vorstellbar.

Um die angesprochenen Interventionsmöglichkeiten effizienter nachzuverfolgen, könnte das metastatische Potential der erzeugten Klone und deren emittiertes Biolumineszenzsignal noch weiter verstärkt werden, indem die Zellen mehrere In-vivo-Passagen durchlaufen, bei denen nach intrasplener Injektion metastatisches Gewebe entnommen und rekultiviert wird. Durch ein- bis zweimalige In-vivo-Passagen konnte bereits in der Arbeitsgruppe um Jenkins et al. die Malignität einer Zelllinie des Mammakarzinoms gesteigert werden.¹²⁰ Das emittierte Biolumineszenzsignal der zuvor mit Luciferase transfizierten Zellen wurde dadurch ebenfalls verstärkt.

Des Weiteren könnten Auswirkungen in diesem Mausmodell durch unterschiedliche Injektionsstellen evaluiert werden. So könnten die Tumorzellen neben der intrasplener Injektion auch intrakardial, intravenös oder orthotop appliziert werden.

Durch die Klonierung von MACC1 und dem Reporter gen Luciferase in einen gemeinsamen Vektor und der erfolgreichen Anwendung im Mausmodell im Rahmen dieser Arbeit soll zukünftig eine möglichst exakte Analyse der MACC1-spezifischen Interventionsstrategien ermöglicht werden. Durch die hieraus abgeleiteten molekularbiologischen Innovationen sollen sich neue Möglichkeiten für eine effektive Therapie der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom ergeben. Auch für andere Krebsentitäten ist ein Nutzen vorstellbar und soll durch gezielte und zügige Forschung möglichst zeitnah seinen Weg in den klinischen Alltag finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom wird stark durch das Auftreten von Metastasen beeinflusst. Bisher wurden zahlreiche molekulare Marker zur Erkennung der frühzeitigen Metastasierung evaluiert, um Niedrig-Risiko- und Hoch-Risiko-Patienten gerade in den frühen Tumorstadien eindeutiger zu unterscheiden. Unsere Arbeitsgruppe hat MACC1 als neues metastasierungsinduzierendes Gen identifiziert. MACC1 ist ein wichtiger prognostischer Marker für die Metastasierung beim kolorektalen Karzinom. Es induziert sowohl in vitro Proliferation, Migration und Invasion als auch in vivo die Metastasierung, wie durch Endpunktbestimmungen in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden konnte. MACC1 interagiert mit der Bindungsstelle von SP1, einem Transkriptionsfaktor am Met-Promotor, und induziert so die Met-Expression. Über den HGF/Met-Signalweg wird die Expression von MACC1 gesteigert und die Translokation von MACC1 in den Nucleus gesteuert. Die Domänenstruktur prädestiniert MACC1 als Signaltransduktionsmolekül. Vor allem die SH3-Domäne ist für die Funktion von MACC1 von besonderer Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit war das Imaging der MACC1-induzierten Metastasierung in einem Xenograft-Mausmodell und die Evaluation des Einflusses der SH3-Domäne auf die Funktion von MACC1. Dazu wurden Konstrukte generiert, die das Reportergen Luciferase und MACC1 vom Wildtyp bzw. mutiertes MACC1 (MACC1 Δ SH3) in einem gemeinsamen pIRES-Vektor enthielten. Zusätzlich diente ein Konstrukt, welches ausschließlich das Reportergen Luciferase enthielt, als Kontrollkonstrukt.

Der Erfolg der Klonierung wurde sowohl durch den Kontrollverdau mittels spezifischer Restriktionsenzyme als auch durch Sequenzierungen bestätigt. Die Konstrukte wurden in humane Kolonkarzinomzellen, die intrinsisch eine äußerst geringe Expression von MACC1 aufweisen, stabil transfiziert. Die Expressionsanalysen der Klone erfolgte durch Messungen der Luciferaseaktivität mittels Biolumineszenz, durch quantitative real-time RT-PCR Bestimmungen von MACC1 und durch Western-Blots. Durch Migrations- und Invasions-Assays wurde die Funktionalität der transfizierten Klone evaluiert. Durch diese in vitro Voruntersuchungen konnte eine Auswahl der effektivsten Klone getroffen werden, die für das In-vivo-Imaging benutzt wurden. Die transfizierten Zellklone wurden den Mäusen intrasplenal injiziert und das Tumorwachstum und die Metastasierung mehrmals wöchentlich mittels Biolumineszenzmessungen mit einer hoch sensitiven CCD-Kamera beobachtet. Durch dieses Imaging konnten das Wachstum des

Primärtumors und die Entwicklung von Metastasen zeitlich und räumlich auf nicht invasivem Weg erfolgreich nachverfolgt werden.

Mit diesem Mausmodell soll zukünftig die Grundlage für eine exakte Analyse von MACC1-spezifischen Interventionsstrategien geschaffen werden. Die Generierung eines Konstruktes mit dem Reporter gen Luciferase und MACC1 in einem gemeinsamen Vektor bietet die Möglichkeit, die Effektivität der Ko-Transfektion zweier Transgene und deren gemeinsame Expression in den stabilen Klonen deutlich zu erhöhen im Vergleich zu der Transfektion mittels zweier unabhängiger Konstrukte, wie es in bisherigen Projekten durchgeführt wurde. Die Expression zweier Transgene in einem gemeinsamen Konstrukt kann Auswirkungen auf die biologische Aktivität der Zielproteine haben, wie es vor allem bei Anwendung von Fusionsproteinvektoren zu befürchten wäre. Dass dies unter Verwendung der IRES-Konstrukte nicht der Fall ist, wurde durch In-vitro- und In-vivo-Analysen sichergestellt und mit den Ergebnissen von bisherigen Projekten der Arbeitsgruppe in Bezug auf die MACC1-Aktivität verglichen. Die Verwendung der klonierten IRES-Konstrukte bietet außerdem die Möglichkeit über das Biolumineszenzsignal den therapeutischen Nutzen von MACC1-shRNA, -Inhibitoren oder -Antikörpern zu untersuchen. Dadurch soll es möglich sein, effektive Interventionsstrategien gegen die MACC1-induzierte Metastasierung zu entwickeln. In Zukunft soll dies fester Bestandteil des klinischen Alltags darstellen, um eine Prävention der Metastasierung sowohl beim kolorektalen Karzinom als auch bei anderen Krebsentitäten zu erzielen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Caspary WF, Wehrmann T. Dünn- und Dickdarm. In: Greten H, ed. Innere Medizin. 12th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005:696-767.
- 2 Pschyrembel. Berlin: Walter de Gruyter, 2004.
- 3 Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends. 7. überarbeitete Auflage: Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. eds. 2010. (Accessed January 16, 2011, at http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/re2vZ21t28lr8Y/PDF/22aJOdYnmXV0I.pdf.)
- 4 Cancer: World Health Organization, February 2006. (Accessed May 24, 2009 at www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.)
- 5 Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293(2):172-82.
- 6 Stirbu I, Kunst AE, Vleems FA, et al. Cancer mortality rates among first and second generation migrants in the Netherlands: Convergence toward the rates of the native Dutch population. *Int J Cancer* 2006; 119(11):2665-72.
- 7 Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441(7092):444-50.
- 8 Geißler M, Graeven U. Das kolorektale Karzinom. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005.
- 9 Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1998; 128(11):900-5.
- 10 Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326(10):658-62.
- 11 Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2004; 126(6):1634-48.
- 12 Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Tremaine WJ, et al. Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1996; 10(2):432-40.
- 13 Hawk ET, Levin B. Colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2):378-91.
- 14 Lippert H. Lehrbuch Anatomie, 6th ed. München: Urban & Fischer, 2003.
- 15 Lüllmann-Rauch R. Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.
- 16 Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110 (4), 1001.
- 17 Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 2005; 307 (5717), 1904.
- 18 Radtke F, Clevers H, Riccio O. From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med* 2006; 6 (3), 275.
- 19 Morson BC. President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med*. 1974; 67(6 Pt 1):451-7.
- 20 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.
- 21 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87(2):159-70.
- 22 Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:695-723.

- 23 Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009; 76(1):1-18.
- 24 Salk JJ, Salipante SJ, Risques RA, et al. Clonal expansions in ulcerative colitis identify patients with neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(49):20871-6.
- 25 Preston SL, Wong WM, Chan AO, et al. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 2003; 63(13):3819-25.
- 26 Shih IM, Wang TL, Traverso G, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2640-5.
- 27 Denk H, Klimpfinger M. Colorectal cancer: classification and aspects of the proliferation kinetics. *Wien Med Wochenschr* 1988; 138(11-12):288-92.
- 28 Pfannschmidt J, Dienemann H, Hoffmann H. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series. *Ann Thorac Surg* 2007; 84(1):324-38.
- 29 Poston GJ, Adam R, Alberts S, et al. OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(28):7125-34.
- 30 Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, et al. Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol* 2008; 46(8):799-840.
- 31 Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 1993; 306(6880):752-5.
- 32 Fidler IJ The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-8.
- 33 Ghadjar P, Rubie C, Aebersold DM, Keilholz U. The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125(4):741-5.
- 34 Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004; 430: 1034-1040.
- 35 Trepel M, Arap W, Pasqualini R. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol* 2002; 6, 399–404.
- 36 Brown D, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* 2004; 5, 365–374.
- 37 Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol* 1998; 153, 865–873.
- 38 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1998; 246, 1306–1309.
- 39 Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol* 2010; 2010:135285.

- 40 Kumar A, Hou X, Lee C, et al. Platelet-derived growth factor-DD targeting arrests pathological angiogenesis by modulating glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *J Biol Chem.* 2010; 285(20):15500-10.
- 41 Gatzka CE, Oh SY, Blobe GC. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal.* 2010; 22(8):1163-74.
- 42 Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, Shirakusa T. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25(3):443-8.
- 43 Zvibel I, Brill S, Halpern Z, Papa M. Hepatocyte extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth factor receptors in human colon cancer cells. *Exp. Cell Res* 1998; 245, 123–131.
- 44 Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, et al. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23, 7366–7377.
- 45 Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(2):99-119.
- 46 Mandel JS. The effect of fecal occult blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 343: 1603–1607.
- 47 Imperiale T, Ransohoff D, Itzkowitz S, Turnbull B, Ross M. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351 (26): 2704–14.
- 48 Heresbach D, Manfredi S, D'halluin PN et al. Review in depth and meta-analysis of controlled trials on colorectal cancer screening by faecal occult blood test. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 427–433.
- 49 Hoffman RM, Steel S, Yee EF, Massie L, Schrader RM, Murata GH. Colorectal cancer screening adherence is higher with fecal immunochemical tests than guaiac-based fecal occult blood tests: A randomized, controlled trial. *Prev Med.* 2010; 50(5-6):297-9.
- 50 Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH et al. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 162–168.
- 51 Layer G, Riemann JF. Screening of colorectal neoplasm. *Radiologe* 2008; 48(1):26-32.
- 52 Kung JW, Levine MS, Glick SN et al. Colorectal cancer: screening double-contrast barium enema examination in average-risk adults older than 50 years. *Radiology* 2006; 240: 725–735.
- 53 Rollandi GA, Biscaldi E, DeCicco E. Double contrast barium enema: technique, indications, results and limitations of a conventional imaging methodology in the MDCT virtual endoscopy era. *Eur Radiol* 2007; 61: 382–387.
- 54 Bertini L, Campagnano S, Lanciotti S, et al. CT and MR virtual colonoscopy: indications, limits and comparison with conventional colonoscopy. *Clin Ter.* 2006; 157(2):129-34.
- 55 Rockey DC. Computed tomographic colonography: current perspectives and future directions. *Gastroenterology* 2009; 137(1):7-14.
- 56 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind CH. eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th ed.: Oxford: Wiley & Blackwell, 2009.

- 57 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96 (19), 1420.
- 58 Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008; 134(5):1296-310.
- 59 Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Chemotherapy of colorectal cancer. *Internist (Berl)*. 2009; 50(11):1239-52.
- 60 Hegewisch-Becker S, Vanhoefer U, Kubicka S, et al. Palliative treatment for colorectal cancer. *Onkologie*. 2009; 32 Suppl 2:13-6.
- 61 Loggie BW. Surgical concepts in the treatment of colorectal cancer. *Semin Roentgenol*. 1996; 31(2):111-7.
- 62 Xi HQ, Zhao P, Han WD. Clinicopathological significance and prognostic value of LRP16 expression in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(13):1644-8.
- 63 Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen C. An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *JAMA*. 1993; 270(8):943-7.
- 64 Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003; 39(6):718-27.
- 65 Di Costanzo F, Doni L. Adjuvant therapy in colon cancer: which treatment in 2005? *Ann Oncol*. 2005; 16 Suppl 4:iv69-73.
- 66 Macdonald JS. Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin* 1999; 49 (4), 202.
- 67 Metastasis associated in colon cancer 1. Aliases & Descriptions (Accessed April 3, 2010, at <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MACC1>.)
- 68 Morohara K, Tajima Y, Nakao K, et al. Gastric and intestinal phenotypic cell marker expressions in gastric differentiated-type carcinomas: association with Ecadherin expression and chromosomal changes. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132:363–375.
- 69 Harada T, Baril P, Gangeswaran R, et al. Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 2007; 96:373–382.
- 70 Herbergs J, Hopman AH, De Bruïne AP, Ramaekers FC, Arends JW. In situ hybridization and flow cytometric analysis of colorectal tumours suggests two routes of tumourigenesis characterized by gain of chromosome 7 or loss of chromosomes 17 and 18. *J Pathol* 1996; 179:243–247.
- 71 Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:4549–4552.
- 72 Paschos KA, Canovas D, Bird NC. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal* 2009; 21:665–674.
- 73 Pawson T, Schlessingert J. SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*. 1993; 3(7):434-42.
- 74 Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 7):1253-63..
- 75 Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 1995; 373(6515):573-80.
- 76 Musacchio A, Gibson T, Lehto VP, Saraste M. SH3--an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett*. 1992; 307(1):55-61.

-
- 77 Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 2000; 287, 2204–2215.
- 78 Chandra BR, Gowthaman R, Akhouri RR, Gupta D, Sharma A Distribution of proline-rich (PxxP) motifs in distinct proteomes: functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004; 17, 175–182
- 79 Castagnoli L, Costantini A, Dall’Armi C, et al. Selectivity and promiscuity in the interaction network mediated by protein recognition modules. *FEBS Lett.* 2004; 567, 74–79.
- 80 Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med.* 2010; 88(1):11-8.
- 81 Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(12):2356-9.
- 82 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:915–25.
- 83 Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med.* 2009; 15(1):59-67.
- 84 Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen- activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (1), 247.
- 85 Stein U, Smith J, Walther W, Arlt F. MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes. *Cell Cycle.* 2009; 8(15):2467-9.
- 86 Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(5):381-93.
- 87 Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976; 36, 4562-9.
- 88 Arlt, F. Das neu identifizierte Gen MACC1 ist ein Regulator des HGF/Met-Signalweges und ist prognostisch für die Metastasierung des Kolonkarzinoms. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I/ Institut für Biologie, Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin 2008.
- 89 Kelch, I. Etablierung eines shRNA-basierten stabilen Knockdown-Modells zur Untersuchung der Funktion von MACC1 bei der Metastasierung humaner Kolonkarzinomzellen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I/ Institut für Biologie, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin 2009.
- 90 Davies J, Jimenez A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29(5 Suppl); 1089–1092.
- 91 Jakupović, M. Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α) durch die circadianen Faktoren CRY1/PER1 und Induktion der Tumorprogression in der Leber durch Hepatozyten-spezifische Defizienz der Mangan-Superoxid-Dismutase. Fachbereich Chemie, Doktorarbeit, Technische Universität Kaiserslautern 2009.
- 92 Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 2007; 37(2):120-126.
- 93 Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, et al. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res.* 2005; 307(2):418-26.

-
- 94 Dombrowski Y, Szalay AA. Lebende Organismen zur simultanen Detektion und Therapie von Tumoren. *Biospektrum*. 2005; 5: 632-633.
- 95 Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; (8):895-904.
- 96 Greenway B. Hepatic metastases from colorectal cancer: resection or not. *BrJSurg*. 1988; 75: 513-9.
- 97 Chen X, Zhang X, Larson CS, Baker MS, Kaufman DB. In vivo bioluminescence imaging of transplanted islets and early detection of graft rejection. *Transplantation*. 2006; 81(10):1421-7.
- 98 Zumsteg A, Strittmatter K, Klewe-Nebenius D, Antoniadis H, Christofori G. A bioluminescent mouse model of pancreatic β -cell carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010; 31(8):1465-74.
- 99 Naylor L.H. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58:749-757
- 100 Meager A. Biological assays for interferons. *J Immunol Methods*. 2002; 261(1-2):21-36.
- 101 Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(8):733-44.
- 102 Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:3761-6
- 103 Kessler HH. Comparison of currently available assays for detection of hepatitis B virus DNA in the routine diagnostic laboratory. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005, 5(4):531-6.
- 104 Li D., Butt A., Clarke S., Swaminathana R. Real-time quantitative PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of thyroid cancer patients and healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022:147-51.
- 105 Kessler HH. Comparison of currently available assays for detection of hepatitis B virus DNA in the routine diagnostic laboratory. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5(4):531-6.
- 106 Sanchez-Ruiz JM. Protein kinetic stability. *Biophys Chem*. 2010; 148(1-3):1-15.
- 107 Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002; 4:235-60.
- 108 Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*. 2000; 2(6):491-5.
- 109 Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, et al. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Mol Imaging*. 2004; 3(2):117-24.
- 110 Dikmen ZG, Gellert GC, Dogan P, et al. In vivo and in vitro effects of a HIF-1 α inhibitor, RX-0047. *J Cell Biochem*. 2008; 104(3):985-94.
- 111 Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(8):733-44.
- 112 Wang Y, Sun Z, Peng J, Zhan L. Bioluminescent imaging of hepatocellular carcinoma in live mice. *Biotechnol Lett*. 2007; 29(11):1665-70.
- 113 Zeamari S, Rumping G, Froot B, Lyons S, Stewart FA. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer*. 2004; 90(6):1259-64.

- 114 Dinca EB, Sarkaria JN, Schroeder MA, et al. Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy. *J Neurosurg.* 2007; 107(3):610-6.
- 115 Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R. In vivo imaging of NF-kappa B activity. *J Immunol.* 2002; 168(3):1441-6.
- 116 Zhang W, Feng JQ, Harris SE, Contag PR, Stevenson DK, Contag CH. Rapid in vivo functional analysis of transgenes in mice using whole body imaging of luciferase expression. *Transgenic Res.* 2002; 10(5):423-34.
- 117 Honigman A, Zeira E, Ohana P, et al. Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther.* 2001; 4(3):239-49.
- 118 Hoffman RM. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(10):796-806.
- 119 Maiwald, G. In vivo bioluminescence imaging for monitoring of siRNA mediated luciferase knockdown in tumor models. Tierärztlichen Fakultät, Department für Veterinärwissenschaften, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München 2009.
- 120 Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J, Purchio T. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(4):R444-54.
- 121 Timpson P, Serrels A, Canel M, Frame MC, Brunton VG, Anderson KI. Quantitative real-time imaging of molecular dynamics during cancer cell invasion and metastasis in vivo. *Cell Adh Migr.* 2009; 3(4):351-4

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Publikation

A. Pichorner, U. Sack, D. Kobelt, I. Kelch, F. Arlt, J. Smith, W. Walther, P. M. Schlag and U. Stein. A new animal model for in vivo monitoring of MACC1-induced metastasis in colorectal cancer and its therapeutical intervention.

Manuskript in Vorbereitung zur Veröffentlichung bei Clinical & Experimental Metastasis.

Kongressteilnahmen

A. Pichorner, U. Sack, D. Kobelt, F. Arlt, J. Smith, W. Walther, P. M. Schlag and U. Stein. In vivo imaging of colon cancer metastasis in mice: Impact of the newly identified gene MACC1

Poster-Vortrag auf der 20th European Student Conference 2009, Berlin

Session Winner

Abstract veröffentlicht in European Journal of Medical Research, 14. 140-140 Suppl. II.

Teilnahme am 1st Cancer Day ("Molecular Optical Imaging in Oncology"), 2009, Berlin

A. Pichorner, U. Sack, D. Kobelt, F. Arlt, J. Smith, W. Walther, P. M. Schlag, U. Stein. In vivo imaging of MACC1 induced metastasis formation in a xenograft mouse model based on an IRES-vector harboring the reporter luciferase and the gene MACC1

Poster-Vortrag auf dem Deutschen Krebskongress 2010, Berlin

Abstract veröffentlicht in Onkologie, 33: 65-65 Suppl.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Andreas Pichorner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vivo-Imaging der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom in einem Xenograft-Mausmodell – Einfluss des neuidentifizierten Metastasierungsgens MACC1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Den Grundstein für diese Arbeit hat meine Familie gelegt, weshalb ich sie auch als Erstes erwähnen möchte. Sie glaubten an mich und investierten nicht nur Zeit sondern auch viel Geld, um mir die bestmögliche Ausbildung zukommen zu lassen und mein Wunsch eines Medizinstudiums zu verwirklichen. Vor allem meine Mutter gab mir immer eine unglaubliche Sicherheit, so dass ich immer wusste, dass ich volle Rückendeckung von ihr bekomme, egal für welchen Weg ich mich entscheide. Sie arbeitet sehr hart und ist immer sehr bescheiden, was die eigenen Wünsche angeht, deshalb sehe ich es nicht als selbstverständlich an, dass sie mir ein so gutes Leben ermöglicht. Anteil an dieser Arbeit hat aber natürlich die gesamte Familie. Wenn alle Angehörigen zusammen kamen, fragten sie mich immer interessiert über die Fortschritte im Labor aus und oft musste ich resigniert von Misserfolgen berichten, woraufhin sie mich immer aufbauten und zum Durchhalten motivierten.

Auch wenn sie für mich zu meiner Familie zählt, möchte ich an dieser Stelle noch einmal ganz besonders meiner Freundin Anne danken. Sie hat mir immer den Zuspruch gegeben, den ich brauchte und mit ihr konnte ich auch fachlich vertieft diskutieren, obwohl sie anfänglich noch keine Laborerfahrungen hatte. Sie hat sich immer versucht in die Problematik meiner Arbeit einzudenken und mit mir zusammen Lösungen zu finden. Während der Promotion haben wir eine schwere Krise durchgemacht und ich bin sehr glücklich, dass uns unsere Wege wieder zusammen geführt haben, denn ohne dich habe ich mich unvollständig gefühlt und auch diese Arbeit wäre ohne dich unvollständig geblieben.

Durch meine Arbeit im Labor habe ich nicht nur das Gefühl entwickelt, ein fester Bestandteil der Arbeitsgruppe geworden zu sein, sondern darüber hinaus glaube ich auch, dass sich Freundschaften entwickelt haben. Ich bin sehr dankbar für das Gemeinschaftsgefühl, das in unserer Gruppe herrscht. Die Möglichkeit Teil dieser Gruppe zu sein, gab mir Prof. Dr. Peter M. Schlag und Prof. Dr. Ulrike Stein. Vor allem Prof. Dr. Ulrike Stein bin ich zu tiefem Dank verpflichtet, denn als ich ein völliger Anfänger im Bereich der Laborarbeit war, schaffte sie es immer wieder, mich zum richtigen Zeitpunkt zu motivieren und auf Kurs zu halten. Die Zusammenarbeit mit einem medizinischen Doktoranden war auch für sie anfangs etwas gewöhnungsbedürftig, aber sie hielt durch und verhalf mir dadurch zu einem völlig neuen Einblick in die wissenschaftliche Arbeit. Durch sie habe ich meine Begeisterung

für MACC1 und dieses Projektes entwickelt. Zu schätzen weiß ich auch, dass sie für mich immer Zeit hatte und so jederzeit über die weiterführende Arbeit diskutiert werden konnte. In der Schreibphase gab sie mir immer sehr wertvolle Tipps und Anregungen, die meiner Meinung nach der Arbeit auf ein höheres Niveau verholfen haben.

Tipps und Anregungen gab es zu jedem Zeitpunkt der Arbeit natürlich auch von allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, wobei vor allem PD Dr. Wolfgang Walther, Ulrike Sack, Dennis Kobelt, Janice Smith, Pia Herrmann und Dr. Mathias Dahlmann hervorgehoben werden müssen.

Ohne die Erfahrung von PD Dr. Wolfgang Walther wäre die erfolgreiche Durchführung des Tierversuches nicht möglich gewesen.

Ulrike Sack war die härteste und wertvollste Diskussionsteilnehmerin, die ich während meiner Laborzeit kennen lernen durfte. Sie erklärte mir schwer Verständliches oft spielerisch und verstand es meine Versuche zu hinterfragen, Fehlerquellen zu entdecken und in Erfolge zu verwandeln. Außerdem half sie mir sehr in der praktischen Durchführung des Tierversuches und ich bin immer noch überzeugt davon, dass eine exzellente Chirurgin an ihr verloren gegangen ist.

Neben Ulrike Sack war es vor allem Dennis Kobelt, der als sehr erfahrener Mitarbeiter im Labor dem Tierversuch zum Erfolg verhalf. Auf seine Unterstützung konnte ich auch in der praktischen Durchführung zählen. Außerdem unterwies er mich neben Dr. Franziska Arlt vor allem in der Anfangsphase meiner Laborarbeit in die Klonierung und half mir bei der Suche nach einem geeigneten Vektorsystem.

Die zwei technischen Mitarbeiterinnen, die mir immer zur Seite standen, waren Janice Smith und Pia Hermann. Janice Smith half mir vor allem bei der Zellzucht und weihte mich in die Geheimnisse des Western Blots ein, wobei ich immer noch nicht verstehe, warum ihre Blots besser gelingen.

Pia Hermann schulte mich in der erfolgreichen Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR. Sie zeigte mir mit Ruhe und Präzision zu arbeiten und ersparte mir dadurch sicherlich manch einen Misserfolg.

Dr. Mathias Dahlmann schaffte es vor allem bei den Präsentationen im Rahmen der wöchentlichen Team-Meetings kluge Denkanstöße zu geben und die Ergebnisse geschickt zu hinterfragen, um so ein tieferes Verständnis für die eigene Arbeit zu erzeugen.

Zu guter letzt möchte ich mich noch herzlich bei Dr. Franziska Arlt bedanken. Sie ist zwar nicht mehr Bestandteil der Arbeitsgruppe, jedoch promovierte sie gerade in dem

Labor, als ich anfang. Sie zeigte mir in den ersten Monaten immer gut gelaunt die Grundlagen der Laborarbeit und legte das Fundament für die weiterführenden Versuchsstrecken.