

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Onkogen-induzierte Seneszenz in der kolorektalen  
Adenom-Karzinom-Sequenz und ihre Funktion als  
Prädiktor für das Ansprechen auf 5-FU in der primär  
metastasierten Situation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Haugstetter

aus Stuttgart- Bad Cannstatt

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. C. A. Schmitt  
                          2. Prof. Dr. med. F. R. Greten  
                          3. Prof. Dr. med. L. Zender

Datum der Promotion:             18.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Kolorektales Adenokarzinom</b>	<b>6</b>
1.1.1	Epidemiologie des kolorektalen Adenokarzinoms	6
1.1.2	Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms	6
1.1.3	Prognostisch relevante Faktoren	7
1.1.4	Adenom- Karzinom- Sequenz	8
1.1.5	Das Onkogen ras	10
1.1.6	Therapie des kolorektalen Adenokarzinoms	11
<b>1.2</b>	<b>Apoptose</b>	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>Seneszenz</b>	<b>12</b>
1.3.1	Merkmale von Seneszenz	13
1.3.2	Potentielle Marker für Seneszenz	15
1.3.3	Bedeutung von Onkogen-induzierter Seneszenz in vivo	18
1.3.4	Prämature Seneszenz und Chemotherapeutika	19
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
3.1.1	Zelllinien und Bakterienlinie	23
3.1.2	Medien	23
3.1.3	Lösungen	24
3.1.4	Plasmide	25
3.1.5	Geräte und Zubehör	25
3.1.6	Antikörper	27

<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.1.1	Zelllinien	29
3.2.1.2	Subkultivierung der Zelllinien	30
3.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	30
3.2.1.4	Zellzahl, Wachstumskurven, Viabilität	30
3.2.2	Retrovirale Infektion	31
3.2.2.1	verwendete Plasmide	31
3.2.2.1	Transformation	31
3.2.2.2	Mini- Präparation der DNS	32
3.2.2.3	Maxi-Präparation der DNS	33
3.2.2.4	Photometrische Bestimmung der Konzentration der DNS-Lösung	33
3.2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten	34
3.2.2.6	Transduktion	34
3.2.2.6.1	Calciumphosphat vermittelte Transfektion	34
3.2.2.6.2	Infektion der Zielzellen	35
3.2.3	Fixieren und Paraffineinbettung der Kontrollen	35
3.2.4	Färbemethoden	37
3.2.4.1	Immunhistochemie	37
3.2.4.2	Fluoreszenzfärbung der SAHF	39
3.2.4.3	SA-beta-Gal-Färbung	39
3.2.4.4	Auswertung der Gewebefärbungen	40
3.2.5	Durchflußzytometrische Messungen: BrdU-PI-Profil	40
3.2.6	Auswahl der Patienten und Follow-up Daten	41
3.2.7	K- <i>ras</i> Onkogen Mutationsassay	42
3.2.8	Statistik	42

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1 Herstellung von Seneszenzkontrollen aus Fibroblasten	43
4.2 Seneszenz in Kryogeweben	47
4.3 Seneszenz in Paraffingeweben	53
4.4 Evaluation klinischer Relevanz	65
<b>5 Diskussion</b>	<b>73</b>
5.1 Vergleich mit der aktuellen Literatur	74
5.2 Kritische Bemerkungen	80
5.3 Ausblick	81
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>85</b>
7.1 Literaturverzeichnis	85
7.2 Abbildungsverzeichnis	95
7.3 Tabellenverzeichnis	96
7.4 Abkürzungsverzeichnis	97
7.5 Publikationsverzeichnis	99
<b>8 Danksagung</b>	<b>100</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>101</b>
<b>10 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>103</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Kolorektales Adenokarzinom**

#### **1.1.1 Epidemiologie des kolorektalen Adenokarzinoms**

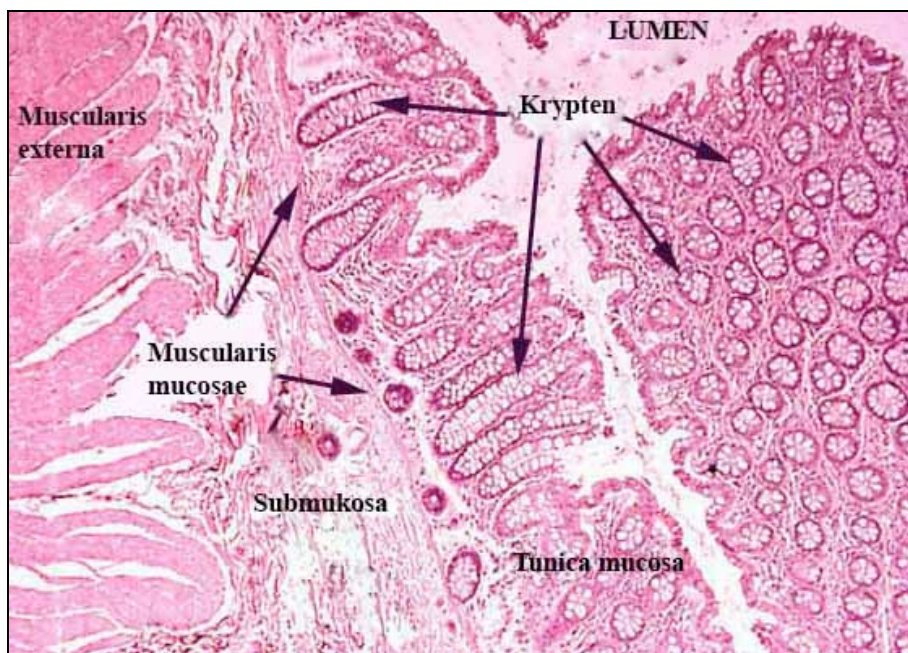
Das kolorektale Adenokarzinom ist für 95 % aller malignen Kolontumore verantwortlich und ist mit mehr als 73 000 Neuerkrankungen im Jahr 2004 eine der häufigsten Erkrankungen in Deutschland<sup>1</sup>. Das Lebenszeitrisiko, an Darmkrebs zu erkranken, liegt bei 6 %. Diese Rate blieb nach einer Zunahme seit 1980 in den letzten Jahren nahezu unverändert<sup>1</sup>. Im Jahr 2008 verstarben über 26 000 Menschen in Deutschland an bösartigen Neubildungen des Darms<sup>2</sup>. Damit steht der Darmkrebs nach dem Bronchialkarzinom an zweiter Stelle der Krebstodesursachen<sup>2</sup>. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt bei Männern 67 Jahre und bei Frauen 72 Jahre, wobei weniger als 10 % der Erkrankungen vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert werden<sup>1</sup>.

#### **1.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms**

Neben exogenen Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms, zu denen fettreiche ballaststoffarme Ernährung<sup>3</sup>, Adipositas<sup>4</sup> und sitzende Tätigkeiten<sup>5</sup> gehören, gibt es zahlreiche endogene Risikofaktoren. Hierzu zählen genetische Prädispositionen, die vor allem bei Erkrankungen im jungen Alter eine große Rolle spielen. Zu den häufigsten erblichen Prädispositionen zählen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom-syndrom (HNPCC-Syndrom), die zusammen für 3-8 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich sind<sup>6</sup>. Zu den endogenen Risikofaktoren rechnet man auch das Vorkommen von multiplen oder solitären Adenomen ohne genetische Disposition als präkanzeröse Läsion gemäß dem Adenom-Karzinom-Sequenz-Modell nach Vogelstein<sup>7</sup>, auf das später näher eingegangen wird. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa stellen ebenfalls Risikofaktoren dar<sup>8</sup>.

### 1.1.3 Prognostisch relevante Faktoren

Die Dickdarmschleimhaut lässt sich histologisch in mehrere Schichten unterteilen (Abbildung 1). Die dem Lumen am nächsten liegende Schicht, die Tunica mucosa mit Lamina epithelialis mucosae und Lamina propria mucosae, ist gekennzeichnet durch zahlreiche dicht nebeneinander stehende Krypten mit vielen Enterozyten und den schleimbildenden Becherzellen. Dieser Schicht schließen sich eine dünne Muscularis mucosae, die Submukosa und die Muscularis externa an<sup>9</sup>.



**Abbildung 1: Kolonschichten.** HE-Färbung eines in Paraffin eingebetteten humanen Kolonpräparates. Histologischer Aufbau der Kolonschichten (modifiziert nach Ref. 10). Vom Lumen ausgehend erkennt man die Tunica mucosa, in der Lamina epithelialis mucosae und die dazwischen liegende Lamina propria mucosae die Krypten bilden. Darunter liegen die Muscularis mucosae, die Submukosa und die Muscularis externa.

Das kolorektale Karzinom geht von den Epithelzellen aus und wird über die lokale Gewebeanvasion des Tumors (pT), den lokalen Lymphknotenbefall (pN) und die Fernmetastasierung (M) nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Daraus leitet sich die Stadieneinteilung nach AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/ Union International Contra Cancer) ab. Höhere UICC-Stadien gehen mit niedrigeren Überlebenschancen einher. So beträgt die 5-Jahresüberlebensrate bei einem lokalisierten Kolonkarzinom (UICC Stadium I und II) 72-93 %, bei

einem regional metastasierten Kolonkarzinom (UICC Stadium III) 27-83 % und bei einem fernmetastasierten Kolonkarzinom (UICC Stadium IV) nur noch ca. 8 %<sup>11</sup>. Ein weiterer prognostisch verwertbarer histopathologischer Marker ist der Entdifferenzierungsgrad, das sogenannte Grading (G)<sup>12</sup>. Auch die Lokalisation des Tumors beeinflusst die Überlebensprognose, so gehen Karzinome des Rektums vor allem in den frühen Stadien mit einer schlechteren Prognose einher als Karzinome des Kolons<sup>13</sup>. Andere prognostische Faktoren sind das Alter<sup>14,15,16</sup>, das Geschlecht<sup>16</sup>, erhöhte Serumwerte des Tumormarkers Carcinoembryonales Antigen (CEA)<sup>15</sup> und die Anzahl der metastasierten Organe<sup>15</sup>. Typischerweise ist das kolorektale Karzinom meist asymptomatisch. Es kann jedoch zu offenen oder okkulten Blutungen bis zur Anämie kommen oder durch Einengung des Darmlumens zu Darmkrämpfen, Durchfällen, Verstopfung und Bleistiftstühlen. Zur B-Symptomatik wird ein Leistungsabfall mit Müdigkeit und Schwäche, sowie ein Gewichtsverlust bis hin zur Kachexie gezählt. Bei fortgeschrittenen Tumoren kann es zu Komplikationen wie einem Darmverschluss, dem sogenannten Ileus, oder zur Perforation der Darmwand mit der Gefahr der Bauchfellentzündung, der Peritonitis, kommen. Eine Obstruktion oder Perforation des Darms zum Zeitpunkt der Erstdiagnose<sup>17</sup> oder das Bestehen einer symptomatischen Erkrankung bei Beginn der Chemotherapie<sup>18</sup> gehen ebenfalls mit einer schlechteren Prognose einher.

### 1.1.4 Adenom- Karzinom- Sequenz

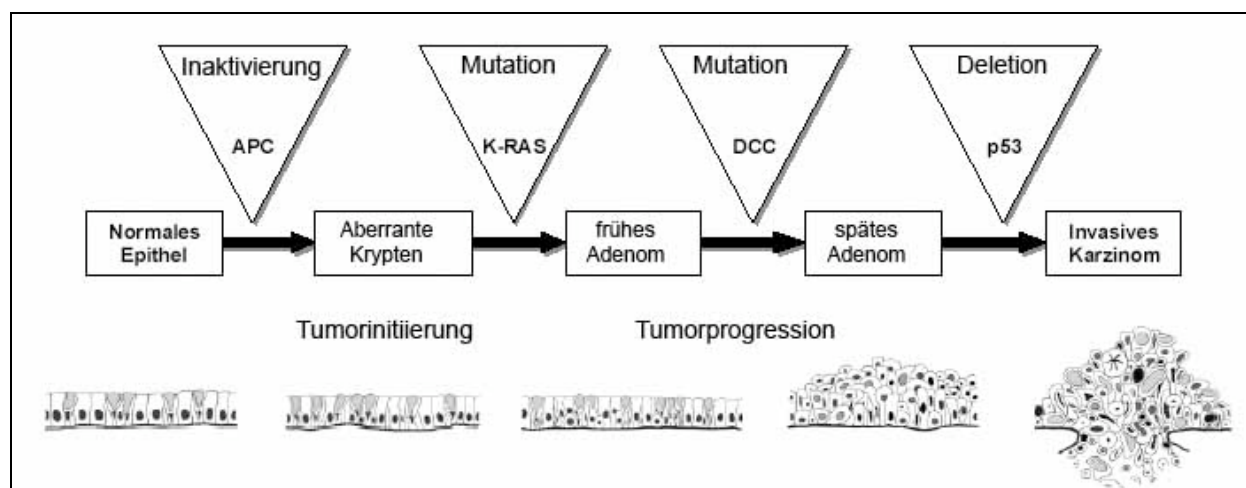
Auf molekulargenetischer Ebene führt man die Entstehung maligner Tumore auf Mutationen verschiedener Gene zurück, die zelluläre Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung steuern. Diese Gene teilt man in zwei Gruppen ein: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene entstehen durch Mutationsereignisse in Proto-Onkogenen, deren Genprodukte das Zellwachstum beeinflussen. Diese Mutationen führen zu einer abnorm gesteigerten autonomen Zellproliferation. Eines der bekanntesten Onkogene ist das *K-ras*-Gen. Tumorsuppressorgene schützen durch ihre Genprodukte die Zelle vor maligner Entartung, indem sie die Zellproliferation in genetisch veränderten Zellen mittels Failsafe-Programmen wie Apoptose oder Seneszenz verhindern. Zu den wichtigsten Tumorsuppressorgenen in der Genese des kolorektalen Karzinoms gehören das *p53*-Gen, das *APC* (adenomatous polyposis coli) -Gen und das *DCC* (deleted in colorectal cancer) -Gen<sup>7</sup>.

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms geht histologisch gesehen von dysplastischen Vorläuferläsionen aus<sup>19</sup>. Im Gegensatz zur Hyperplasie als reiner Vermehrung der Zellen sind



## Einleitung

Dysplasien neoplastische Epithelproliferationen mit zellulären Atypien, Differenzierungsstörungen und Zellarchitekturveränderungen, die die Submukosa nicht infiltrieren. Die meisten dieser Dysplasien finden sich in Adenomen. Adenome sind gutartige von Drüsenzellen ausgehende epitheliale Neoplasien, die als makroskopisch sichtbare Vorwölbungen der Darmmukosa auch Polypen genannt werden. Fearon und Vogelstein haben im Jahre 1990 in ihrem Mehrschrittkanzerogenese-Modell beschrieben, wie kolorektale Karzinome in einer jahre- bis jahrzehntelangen stufenweisen Entwicklung aus Vorläuferläsionen entstehen<sup>7</sup>. Man spricht von der Adenom-Karzinom-Sequenz. Die verschiedenen Entwicklungsstadien vom Adenom zum kolorektalen Karzinom korrelieren mit bestimmten Onko- und Tumorsuppressorgenveränderungen<sup>20</sup>, die in Abbildung 2 vereinfacht dargestellt sind.



**Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz.** Adenom-Karzinom-Sequenz, abgeändert nach Ref. 7. Ausgehend von normalem Epithel entsteht das invasive Karzinom über zahlreiche Zwischenstufen durch die schrittweise Akkumulation tumorigener Mutationen. Nach dysplastischen und hyperproliferativen Veränderungen zu Beginn dieser Abfolge kommt es im Stadium des Adenoms zu einem Wachstumsarrest. Erst Jahre oder Jahrzehnte später können weitere Mutationen zu invasivem Wachstum führen, bei dem maligne Zellen die Muscularis mucosae durchbrechen und die Submukosa erreichen. Dies ist ein Schlüsselkriterium eines malignen Karzinoms. In diesem Mehrschrittkanzerogenesemodell sieht man die *K-ras*-Mutation als frühes und die Mutation von *p53* als spätes Ereignis.

Als früheste präkanzeröse Veränderungen werden zur Zeit die aberranten Krypten (aberrant crypt foci, ACF) angesehen, hyperproliferative Epithelläsionen, in deren DNS sich bereits

Mutationen von *K-ras* und verschiedenen Tumorsuppressorgenen finden<sup>21,22</sup>. Der Übergang zum Karzinom erfolgt schrittweise über adenomatöse Vorstufen durch die Ansammlung weiterer genetischer Veränderungen. Das maligne Potential der Adenome steigt mit zunehmender Größe, Erhöhung des villösen Anteils und Dysplasiegrad<sup>23</sup>. Bei einem Carcinoma in situ respektieren hochgradig dysplastische Zellen noch die Muscularis mucosae als Grenze. Im Gegensatz dazu ist das invasive Wachstum Schlüsselmerkmal eines Karzinoms, bei dem maligne Zellen die Muscularis mucosae durchbrechen und damit die Submukosa erreichen und sich jetzt auch metastatisch absiedeln können. Die Zahl der genetischen Veränderungen nimmt also im Verlauf der Karzinogenese zu. Der Verlust des Tumorsuppressorgens *p53* wird dabei häufig am Übergang zum Karzinom gesehen<sup>20,24</sup>.

### 1.1.5 Das Onkogen *ras*

Die *Ras*- Familie besteht aus den drei Hauptvertretern *H*-, *K*- und *N-ras*. *H-ras* und *K-ras* wurden als transformierende Gene von murinen Retroviren der Stämme Harvey bzw. Kirsten identifiziert, die bei Ratten zu Sarkomen führen: Ha-MSV (Harvey murine sarcoma virus)<sup>25</sup> und Ki-MSV (Kirsten murine sarcoma virus)<sup>26</sup>. 1982 konnte gezeigt werden, dass das *K-ras*- und das *H-ras*- Gen auch in humanen Zellen vorkommt und nach Aktivierung über einen andauernden Proliferationsstimulus als Onkogen fungiert<sup>27</sup>. Für *N-ras* ist kein virales Gegenstück bekannt. Es wurde erstmals aus einem humanen Neuroblastom isoliert<sup>28</sup>. Aktiviertes Ras-Protein kann immortalisierte Nagerzellen transformieren, aber für die Transformation primärer Zellen sind zusätzliche genetische Veränderungen notwendig<sup>29</sup>. Zu einer pathologischen dauerhaften Aktivierung von *ras* kommt es meist durch eine Punktmutation. Dies lässt sich in etwa 30 % aller humanen malignen Tumore nachweisen<sup>30</sup>.

*K-ras* Mutationen auf Chromosom 12p sind die häufigsten *ras*-Mutationen in kolorektalen Tumoren und wurden in 13-82 % der ACF, in 8-83 % der sporadischen kolorektalen Adenome und in 40-65 % der Karzinome gefunden<sup>20,31,32,33,34</sup>. Am häufigsten sind aktivierende Punktmutationen in den Kodons 12, 13 und 64<sup>35</sup>. *Ras*-Mutationen wurden teilweise in Zusammenhang mit schlechterem klinischen Verlauf gebracht<sup>36,37</sup>, andere Studien konnten keine signifikante Korrelation von *ras*-Mutationen und progressionsfreiem oder Gesamt-Überleben feststellen<sup>38</sup>.

### 1.1.6 Therapie des kolorektalen Adenokarzinoms

Zur Therapie des kolorektalen Karzinoms erfolgt in der Regel primär die möglichst vollständige operative Resektion des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand im Gesunden mit En-bloc-Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes. Je nach Lokalisation des Primärtumors sind dazu unterschiedliche Resektionen erforderlich. Auch die Resektion von Fernmetastasen ist unter Umständen möglich. Zusätzlich zur operativen Therapie bieten sich besonders zur Behandlung kolorektaler Karzinome in fortgeschrittenen Stadien die neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie, eventuell in Kombination mit einer Strahlentherapie, an. Beim Rektumkarzinom kann eine neoadjuvante Radiochemotherapie der Reduktion des Tumorumfangs und dadurch der Verbesserung der Operabilität (Downstaging, Downsizing) vor dem operativen Eingriff dienen. Eine adjuvante Chemotherapie im Anschluss an die Operation wird eingesetzt, um eventuell verbliebene Krebszellen zu töten und Rückfälle zu verhindern. Dies trifft vor allem ab UICC Stadium II (beim Kolonkarzinom nur bei zusätzlichen Risikofaktoren im Rahmen von Studien) und ab UICC Stadium III zu. Palliativ kann bei fortgeschrittenen Erkrankungen zur Verbesserung der Lebensqualität chemotherapeutisch behandelt werden.

Bis zur Einführung von Kombinationsprotokollen mit Irinotecan oder Oxaliplatin galt das Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Folsäure (Leucovorin, LV) als Chemotherapeutikum der ersten Wahl beim kolorektalen Karzinom. Das Medikament wurde 1957 erstmals synthetisiert<sup>39</sup> und wird als Antimetabolit wie die strukturell ähnliche Pyrimidinbase Uracil in die Zellen aufgenommen und hier in seine aktive Nukleosidform umgewandelt. Über verschiedene Metabolite wird es dann einerseits als falsches Substrat in die RNS eingebaut, wo es von einem Reparatursystem erkannt und wieder entfernt wird. Dabei kann es zu Doppelstrangbrüchen kommen. Andererseits wird irreversibel die Thymidylatsynthase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidin-Biosynthese, gehemmt<sup>40,41</sup>. Folsäure soll den Effekt von 5-FU verstärken. Etabliert sind verschiedene Verabreichungs- Schemata wie z.B. das De Gramont-, das Ardan-, das Mayo- und das Roswell-Park-Schema, die in Applikationsmodus, -dauer und -dosis variieren.

## 1.2 Apoptose

Neben Mutationen durch exogene Faktoren treten auch Mutationen während des natürlichen Replikationsprozesses auf, die nicht von den zellulären Reparaturmechanismen erfasst werden.

## Einleitung

Dabei rechnet man mit ca. 1 Million Mutationen pro Tag und Mensch, die das Potenzial zur Tumorentstehung tragen<sup>42</sup>. Es gibt mehrere Mechanismen, die als physiologisch relevante und potente Barrieren der Tumorgenese verstanden werden. So werden Zellen mit inadäquaten Proliferationssignalen in Apoptose, den programmierten Zelltod, geführt, um die Entstehung von Tumoren zu verhindern. Auch zelluläre Seneszenz, der terminale Proliferationsarrest, wird zunehmend als solch ein Mechanismus diskutiert<sup>43</sup>.

Kerr erkannte 1972 das Phänomen der Apoptose und brachte es mit bestimmten morphologischen Veränderungen in Verbindung<sup>44</sup>, die sich von denen der Nekrose unterscheiden. Nekrose ist eine Antwort eines Zellverbandes auf eine Verletzung durch äußere Einflüsse. Sie geht mit Schädigung der Zellmembran und Ausschütten des Zellinhaltes in den Interzellularraum einher und löst dadurch eine Entzündungsreaktion aus. Apoptose hingegen ist eine physiologische, nach einem genetisch kontrollierten Muster ablaufende Form des Zelltodes. Man unterscheidet dabei drei Phasen: die Initiations-, die Effektor- und die Exekutionsphase<sup>45</sup>. Auslöser können interne oder externe Signale sein. In der Anfangsphase schrumpfen die Zellkerne, das Zytoplasma und die Mitochondrien bei unbeschädigter Zellmembran. Nach Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen und nach der Verdichtung des Chromatins kommt es zum Zerfall in membranumschlossene apoptotische Körperchen (apoptotic bodies), die u.a. von Makrophagen eliminiert werden. Verschiedene Signalwege haben das gemeinsame Ziel der Initiierung der Caspase-Kaskade<sup>46</sup>. Aktivierte Caspasen, so z.B. Caspase 3 als zentrale Effektorcaspase, spalten bestimmte Proteine im Zellkern und im Zytosol, was zu den beschriebenen morphologischen Veränderungen führt<sup>47</sup>. Viele Chemotherapeutika wirken durch die Induktion des Apoptoseprogrammes und nicht durch wahllose direkte Zellzerstörung<sup>48,49</sup>.

### **1.3 Seneszenz**

Hayflick beschrieb 1965 als erster an primären humanen diploiden Zellen, dass normale somatische Zellen, in Kultur gebracht, nach einer bestimmten Anzahl an Teilungen aufhören, zu proliferieren<sup>50</sup>. Ursache hierfür ist die progressive Verkürzung der Telomere<sup>51,52,53</sup>. Telomere sind Wiederholungen von 5 000-15 000 Basenpaaren mit der Nukleotid-Sequenz (TTAGGG)<sub>n</sub> am Chromosomende. Bei jeder Zellteilung gehen 50-100 Basenpaare verloren. Das Enzym Telomerase repliziert in Keimzellen und pluripotenten Stammzellen die Telomere, verliert aber seine Aktivität mit zunehmender Zelldifferenzierung. Erreicht die Telomerverkürzung ein

kritisches Minimum antwortet die Zelle mit einem terminalen Wachstumsarrest, der replikative Seneszenz oder auch Zellalterung, genannt wird.

Davon abzugrenzen ist die verfrühte, prämatüre Seneszenz, auch Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) genannt, als programmierte protektive Antwort des Organismus auf potentiell karzinogene Schäden ohne Telomerverkürzung. Die erste Beschreibung der OIS kam 1997 von Serrano. Er zeigte, dass die humane diploide Fibroblastenzelllinie IMR90 nach retroviraler Infektion des Onkogens *ras* und damit dessen Überexpression einen seneszenten Phänotyp entwickelt<sup>54</sup>. Prämatüre und replikative Seneszenz scheinen nicht nur phänotypisch, sondern auch auf genetischer Ebene viele Gemeinsamkeiten zu haben. So zeigte sich in Genomanalysen eine breite Überlappung des Transkriptoms, obwohl viele Gene unterschiedlich exprimiert werden<sup>55</sup>. OIS kann durch verschiedene aktivierte Onkoproteine wie BRAF<sup>E600</sup> oder Ras<sup>V12</sup>, aber auch durch den Verlust von Tumorsuppressorproteinen ausgelöst werden<sup>56,57,58,59,60,61,54</sup>. Auch das Onkogen Myc kann unter Einbeziehung von nicht zell-autonomer Komponenten des Tumormikromilieus OIS auslösen<sup>57</sup>. OIS kommt in einer Vielzahl von murinen und humanen Zellarten vor<sup>62,63,64,65</sup>.

### 1.3.1 Merkmale von Seneszenz

Seneszente Zellen sind weitgehend irreversibel wachstumsarretierte viable Zellen mit charakteristischen morphologischen Veränderungen. Sie werden groß und flachen ab, bilden viele Vakuolen im Zytoplasma und formieren zytoplasmatische Ausläufer<sup>66</sup>.

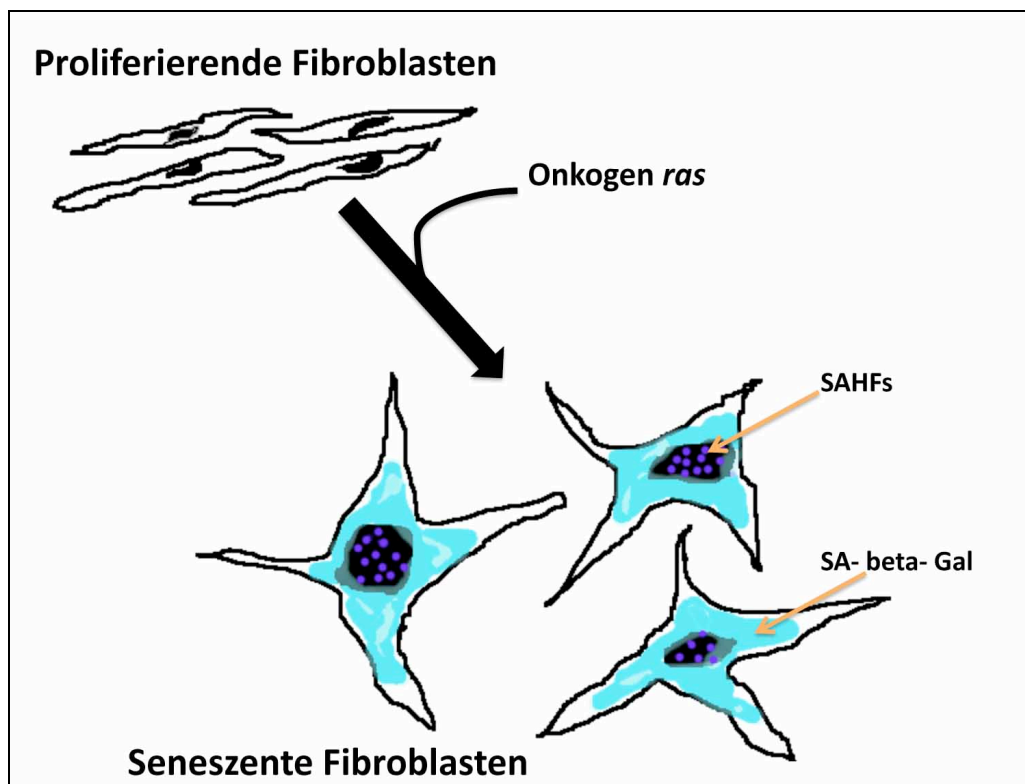
Von präseneszenten, immortalen, quieszenten oder ausdifferenzierten Zellen können sie vor allem unterschieden werden durch den histochemischen Nachweis des Biomarkers Seneszenz-assoziierte-beta-Galaktosidase (SA-beta-Gal) bei saurem pH (bei humanem Gewebe pH 6,0, bei murinem Gewebe pH 5,5)<sup>67</sup>. Dies lässt sich durch eine perinukleäre Blaufärbung visualisieren. Man vermutet, dass die in der Elektronenmikroskopie sichtbare Expansion des lysosomalen Kompartimentes mit einem hohen Expressionslevel des lysosomalen Beta-Galaktosidase-Enzyms einhergeht, und erklärt damit die Diskriminationsfähigkeit des SA-beta-Gal-Assays<sup>68</sup>.

Zellen in Seneszenz hören auf, DNS zu synthetisieren, was sich im Bromid-Uracil (BrdU)-Assay an einem Verlust der Synthese-Phase nach BrdU-Inkorporation zeigt. Gleichzeitig bleiben sie metabolisch aktiv<sup>69</sup>. Klassisch arretieren seneszente Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, es gibt aber auch Daten über Seneszenz-ähnliche Programme, die nicht notwendigerweise einen G1-Arrest aufzeigen, sondern z.B. in der G2-Phase arretieren<sup>70</sup>.

## Einleitung

Ein weiteres typisches Kennzeichen seneszenten Zellen ist die Formierung von im Fluoreszenzmikroskop nach DAPI-Färbung deutlich sichtbaren subnukleären rundlichen Strukturen, die durch die Kondensierung einzelner Chromosomen zu Heterochromatin-Körpern entstehen. Heterochromatin ist eine hochkondensierte Form des Chromatins, das in diesem Zustand Transkriptionsfaktoren nicht zugänglich ist. Diese Heterochromatin-Körper sind assoziiert mit dem G1-Phase-hypophosphorylierten Retinoblastomprotein, mit dem an Lysin 9 trimethylierten Histon 3 (H3K9) und dem Heterochromatinprotein 1 (HP1). Diese Strukturen werden Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) genannt<sup>71,72</sup>. Sie führen zur permanenten und stabilen Repression von Promotoren Proliferations- assoziierter Gene und leisten dadurch ihren Beitrag zur Seneszenz. Inaktivierung der SAHF führt zu einem Bypass der OIS<sup>73</sup>.

Die typischen Merkmale seneszenten Zellen sind am Beispiel der Onkogen-induzierten Seneszenz bei IMR90 Fibroblasten in Abbildung 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Senescente Fibroblasten.** Werden IMR90 Fibroblasten mit dem Onkogen *ras* stabil infiziert, so hören sie auf, zu proliferieren. Sie zeigen einen typischen flachen, vakuolenreichen Phänotyp mit langen Zellausläufern, der typisch für Onkogen-induzierte Seneszenz ist. Im SA-beta-Gal-Assay lässt sich eine perinukleäre Blaufärbung nachweisen und bei stärkerer Vergrößerung zeigen sich im Zellkern punktförmige DAPI-positive Areale, die Seneszenz-assoziierten Heterochromatischen Foci (SAHF).

### 1.3.2 Potentielle Marker für Seneszenz

SA-beta-Gal als etabliertester Marker für Seneszenz lässt sich nur in nativem Gewebe nachweisen, in Paraffingewebe konnte der SA-beta-Gal-Assay bisher noch nicht überzeugend etabliert werden. In der Regel stehen aber für feingewebliche Untersuchungen vor allem in Paraffin eingebettete Gewebe von Patienten zur Verfügung. Für diese Paraffingewebe ist bisher kein alleiniger zuverlässiger Marker bekannt, der eine Zelle als seneszent definieren kann und von anderen wachstumsarretierten Zuständen mit überlappenden Eigenschaften unterscheiden kann<sup>74</sup>. Zahlreiche in Paraffin nachweisbare Marker werden mit OIS assoziiert, obwohl deren genaue Rolle nicht vollständig geklärt ist und manche von ihnen auch unter anderen Bedingungen, wie z.B. unter Apoptose, reguliert sind<sup>75,76</sup>. Einige dieser Marker werden hier kurz vorgestellt.

Ki67 ist ein nukleäres Protein, das während der mitotisch aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird und in ruhenden Zellen nicht nachweisbar ist<sup>77,78</sup>. Der Nachweis von Ki67 zeigt Proliferation und schließt gleichzeitig Seneszenz aus.

Weitere Marker ergeben sich aus den epigenetischen Veränderungen des Chromatins, die die Transkription bestimmter Gene beeinflussen und mit Seneszenz in Assoziation gebracht werden konnten. Chromatin ist ein Komplex aus DNS und nukleären Proteinen. Zu diesen Proteinen gehören die Kern-Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4, die für die Verpackung der DNS zuständig sind. Die Einheit aus DNS und Histonproteinen nennt man Nukleosom, die primäre Struktureinheit des Chromatins. Zusammen mit Nicht-Histonproteinen bilden die kettenförmig angeordneten Nukleosomen das Chromatin. Veränderungen der Chromatinstruktur sind bei der Regulierung der Transkription wichtig<sup>79</sup>. Je nach Stimulus kommt es zu Methylierungen, Phosphorylierungen oder Acetylierungen einzelner Aminosäuren der Histonproteine, was sich direkt auf die Genexpression auswirkt. Heterochromatin ist im Gegensatz zu Euchromatin während der Interphase kondensiert. Durch seine kompakte Struktur und die Assoziation mit spezifischen Proteinen wird die Transkription bestimmter Gene verhindert. Dabei sind vor allem hypoacetylierte und hypermethylierte Histone im Heterochromatin mitverantwortlich für das Ausbleiben der Transkription<sup>80</sup>. Ein Beispiel ist H3K9, das Histon H3, das an der Aminosäure Lysin 9 N-terminal trimethyliert ist (H3K9me<sup>3</sup>)<sup>71</sup>. Es stellt so eine Bindungsstelle für das Heterochromatinprotein 1 (HP1) alpha, beta und gamma zur Verfügung<sup>81,82</sup>. H3K9me<sup>3</sup> und HP1 gelten als Marker für die oben bereits beschriebenen SAHF, einem Schlüsselmerkmal des seneszenten Phänotyps.

## Einleitung

Als Auslöser von Seneszenz werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Häufig wird Seneszenz als eine Antwort auf DNS-Schaden verstanden<sup>83,84,85,86</sup>. Eine Ursache des DNS-Schadens kann ein zu Hyperreplikation und Replikationsstress führendes permanent bestehendes onkogenes Signal sein<sup>85,87</sup>. Ein DNS-Doppelstrangbruch führt zur Phosphorylierung des Histon H2A.x, einem Mitglied der Histonprotein-Familie H2A, an der Aminosäure Serin 139<sup>88</sup>. DNS-Schaden führt auch zu Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 68 des Tumorsuppressors Checkpoint-Kinase-2 (Chk2)<sup>89</sup>. Das nun aktivierte Phospho (p)-Chk2 phosphoryliert wiederum die Aminosäure Serin 15 des Tumorsuppressorproteins P53. Über diese Aktivierung von P53 induziert p-Chk2 den Zellzyklus-Arrest<sup>54,90,91</sup>. Über diesen und andere Effektor-Signalwege ist p-Chk2 aber auch in Apoptose und DNS-Reparatur-Prozesse involviert<sup>92</sup>. Somit führt der DNS-Schaden über p-Chk2 und p-H2A.x zu Seneszenz.

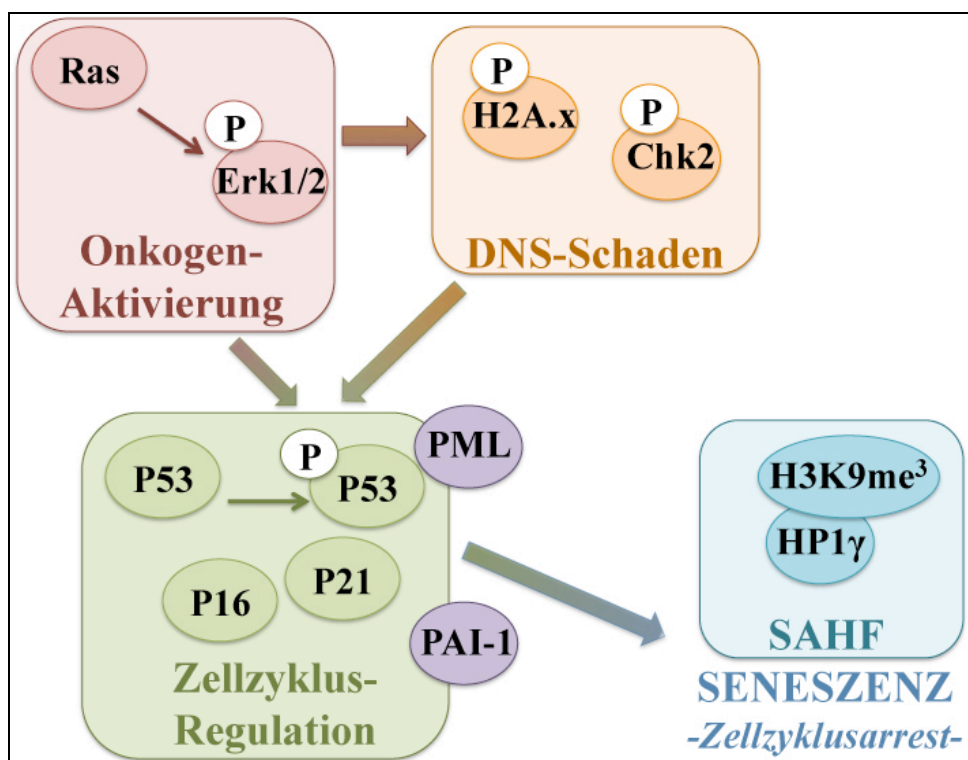
Seneszenz entsteht über die Aktivierung eines Effektor-Signalweges, der das nukleäre Tumorsuppressorprotein P53 einschließt. Aktiviertes Phospho (p)-P53 verursacht über die Expression seines Zielgens P21, eines CDK-Inhibitors, die Aktivierung von Retinoblastom-Protein Rb, welches die Transkription von für die Zellzyklusprogression notwendigen Genen hemmt<sup>93</sup>. Daher ist es an der Induktion des Zellzyklusarrestes, aber auch von Apoptose maßgeblich beteiligt. So treten seneszente Zellen nach plötzlicher Inaktivierung des *p53*-Gens *in vitro* wieder in den Zellzyklus ein<sup>94,95</sup>. P53 und p-P53 stehen also am Anfang des Effektor-Signalweges der Seneszenz-Maschinerie, dienen der Überwachung des Zellzyklus und wurden wegen dieser Schlüsselrolle von Lane als „Wächter der Zelle“ bezeichnet<sup>96</sup>. Die Häufigkeit einer p53-Mutation in kolorektalen Karzinomen liegt bei 40-50 %<sup>97</sup> und wird in der Adenom-Karzinom-Sequenz für ein spätes Ereignis gehalten<sup>7,98</sup>. Betrachtet man das Überleben unter Chemotherapie mit 5-FU von Patienten mit kolorektalem Karzinom, so überleben Patienten mit Wildtyp p53 nach manchen Studien länger als solche mit mutiertem p53<sup>97</sup>. Eine andere Studie zeigt diese Überlebensunterschiede nur bei ganz bestimmten p53-Mutationen und in distalen Tumoren<sup>99</sup>.

Das Retinoblastom-Protein Rb steuert in komplexer Wechselwirkung mit P53 den G1/S-Kontrollpunkt des Zellzyklus. Die Phosphorylierung von Rb wird durch das nukleäre Tumorsuppressorprotein P16 und einen Cyclin-Kinase-Komplex gehemmt. P16 ist also ein negatives Regulatorprotein des Zellzyklus, was in der Signalkaskade nach P53 steht. Studien haben sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erhöhte *p16*-Expression in seneszenten Geweben oder Zellen nachweisen können<sup>56,75,58,100</sup>.

Ein anderes P53 nachgeschaltetes seneszenz-assoziiertes Zielgen kodiert für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 PAI-1<sup>101</sup>, den physiologischen Inhibitor des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ (u-PA). Das u-PA-System setzt proteolytische Vorgänge in Gang, die im



Malignom mit dem Metastasierungsprozess und der Tumorzellinvasion in Verbindung gebracht werden<sup>102</sup>. So sind hohe Spiegel von u-PA und PAI-1 in Tumoren oder hohe PAI-1-Plasmaspiegel mit schlechter Prognose assoziiert<sup>103,104,105,106</sup>.



**Abbildung 4: Seneszenzmarker.** Überblick über verschiedene Marker, die mit Seneszenz assoziiert werden. Das aktivierte Onkogen *ras* phosphoryliert Erk1/2. Ein z.B. durch Hyperproliferation entstandener DNS-Schaden lässt sich über p-H2A.x und p-Chk2 nachweisen. Onkogenaktivierung und DNS-Schaden können über verschiedene nachgeschaltete Signalwege zum Proliferationsstopp führen. Wichtige Proteine dieser Effektor-Signalwege sind P53 und p-P53, P16, P21, PML und PAI-1. Der terminale Zellzyklusarrest Seneszenz geht einher mit der Formierung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci, den SAHF. Der Nachweis von SAHF gelingt über die beiden Marker H3K9me<sup>3</sup> und HP1  $\gamma$ .

Ein weiterer interessanter Marker stellt das Promyelozytische Leukämie Protein PML dar. PML ist Bestandteil von großen Multiprotein-Kernkomplexen, häufig als PML-Kernkörperchen (PML-Bodies) bezeichnet<sup>107</sup>. In Färbungen zeigen sich diese PML-Bodies in einem nukleär gesprenkelten Bild. Sie sind in die Kontrolle verschiedener zellulärer Ereignisse verwickelt, unter anderem von Apoptose, Zellproliferation und Seneszenz<sup>108</sup>. PML fungiert dabei als

Koaktivator von P53 und ist erforderlich für die P53-abhängige Induktion von Apoptose und zellulärer Seneszenz nach der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder onkogener Aktivierung<sup>109,110,111</sup>. Gleichzeitig besitzt PML auch eine antiproliferative Funktion als Zielprotein von P53<sup>112</sup>. In Malignomen des Kolons oder Rektums, der Prostata, Brust, Lunge und einigen weiteren Organen geht die PML-Proteinexpression häufig verloren<sup>113,114</sup>.

Die MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen P44 und P42, oder auch Erk1 und Erk2 genannt, sind Teil einer Proteinkinasekaskade, die an der Regulation von Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt ist<sup>115,116</sup>. Durch das Onkogen *ras* werden sie durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 aktiviert.

Einen schematischen Überblick über das Zusammenspiel einiger seneszenz-relevanter Marker zeigt Abbildung 4.

### 1.3.3 Bedeutung von Onkogen-induzierter Seneszenz *in vivo*

Für Kritiker war Seneszenz lange Zeit ein *in vitro* Phänomen, das entweder durch den Schock der Umstellungen bei der Kultivierung von Zellen in Zellkultur (Zellkulturschock) oder durch supraphysiologische Konzentrationen von aktiviertem Ras verursacht wird<sup>117,118</sup>. In den letzten Jahren sammeln sich zahlreiche Hinweise für die Bedeutung von OIS in *in vivo* Läsionen. Dazu gehören vor allem prä-maligne Läsionen: humane dermale Neurofibrome<sup>60</sup>, humane oder murine Prostataadenome<sup>59</sup>, murine pankreatische intraduktale Neoplasien<sup>75</sup>, humane Naevuszell-Naevi<sup>58</sup> und murine Lungenadenome<sup>119</sup>. Auch im Kolonadenom konnte Seneszenz über SA-beta-Gal-Färbungen gezeigt werden<sup>84</sup>.

In solchen frühen Tumovorläuferläsionen konnte sowohl ein DNS-Schaden durch aktivierte Onkogene<sup>84,86</sup> als auch die Präsenz von SAHF<sup>75,118</sup> nachgewiesen werden. In einem Mausmodell mit dem Onkogen *H-ras* konnte gezeigt werden, dass seneszente Zellen nicht wieder in den Zellzyklus eintreten können und keine Tumore entwickeln<sup>120</sup>. Eine kurze Reaktivierung von P53 in P53-defizienten Tumoren reicht aus, um irreversible OIS auszulösen<sup>121,122</sup>. Diese Beobachtungen führen zunehmend zur Annahme, dass OIS ähnlich wie Apoptose als Mechanismus zur Suppression der Tumorigenese *in vivo* dient, der bei der Progression zum invasiven Karzinom verloren geht oder supprimiert wird<sup>56,57,84,85,86,87,123</sup>. Früher wurden Präkanzerosen allein wegen der geringeren Anzahl onkogener Mutationen als weniger aggressiv angesehen<sup>124</sup>. In einem neueren Modell der Tumorigenese wird die Präkanzerose hingegen deshalb für weniger aggressiv gehalten, weil sie noch über einen suffizienten Schutz-

mechanismus, z.B. den der Seneszenz, verfügt. Dabei löst die Aktivierung eines Onkogens einen DNS-Schaden aus, der den Schutzmechanismus Seneszenz anschaltet und dadurch die Progression zum invasiven Karzinom verhindert<sup>125</sup>.

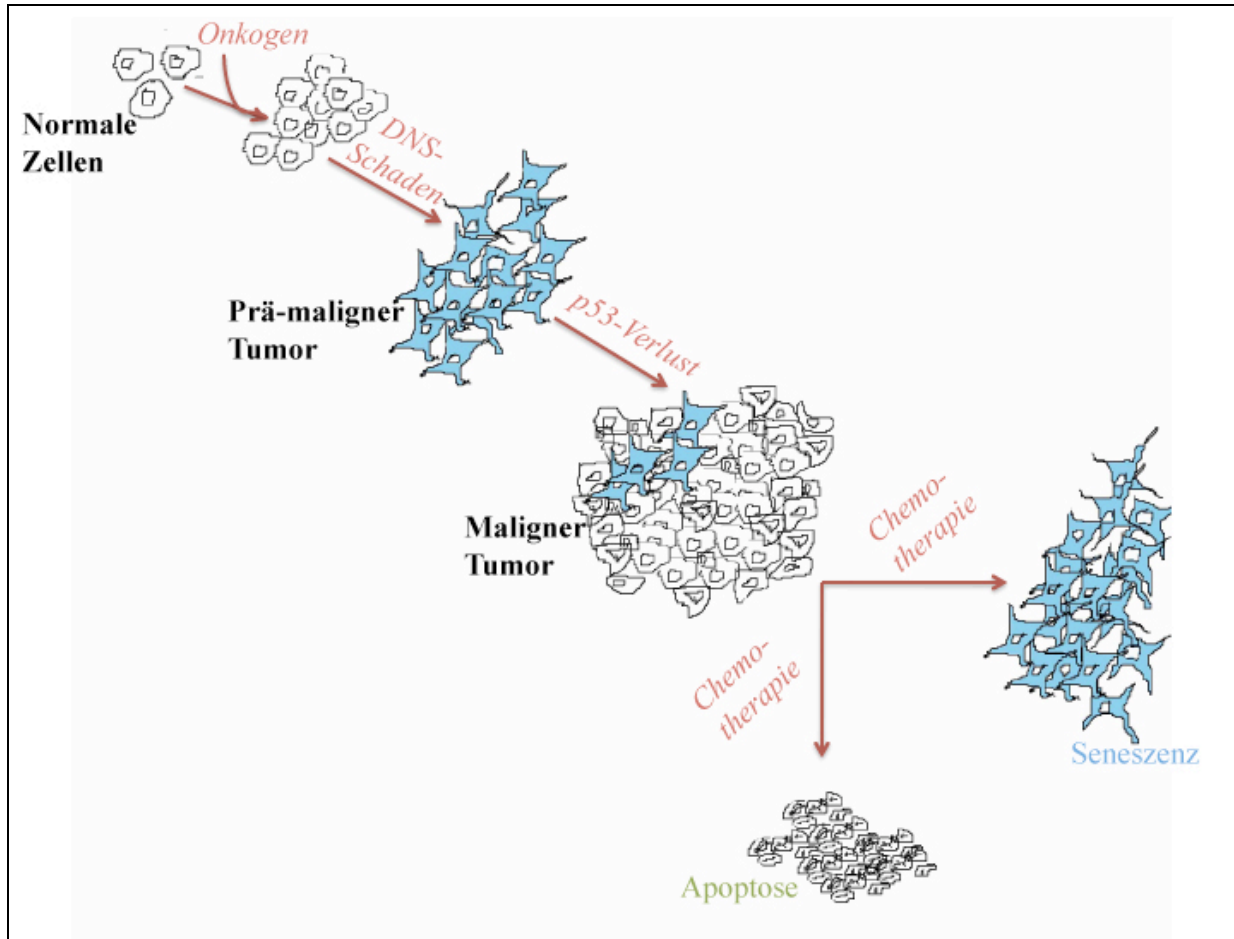
### 1.3.4 Prämatüre Seneszenz und Chemotherapeutika

Invasive Malignome sind durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet. In chemotherapeutisch behandelten murinen Lymphomen konnte jedoch im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen Seneszenz (Therapie-induzierte Seneszenz, TIS) gezeigt werden<sup>126</sup>.

Die meisten Chemotherapeutika induzieren vermutlich Apoptose, aber auch TIS<sup>127</sup>. Die Induktion von TIS mittels DNS-Schädigung durch Gamma-Bestrahlung und durch diverse Chemotherapeutika konnte in Tumorzellen nachgewiesen werden. Zu diesen Chemotherapeutika zählen unter anderen der Topoisomerase I-Inhibitor Captophecin, der Topoisomerase II-Inhibitor Adriamycin und das zu DNS-Strang-Querverknüpfungen führende Cisplatin<sup>128,129</sup>. Auch für 5-FU konnte gezeigt werden, dass es in Fibroblasten zu einem seneszenten Phänotyp mit erhöhten Konzentrationen von Beta-Galaktosidase führt<sup>130</sup>. Ob Apoptose oder Seneszenz als Effektorweg entscheidend ist, scheint von vielen Faktoren abzuhängen. So induzieren zum Teil niedrige Dosen Seneszenz und hohe Dosen Apoptose<sup>127,131</sup>. Ausserdem ist der genetische Aufbau des Tumors mitentscheidend<sup>132</sup>. *In vivo* konnte TIS in murinen und humanen Geweben gezeigt werden<sup>126,133,134,129</sup>. Nach neoadjuvanter Therapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin und 5-FU zeigen die OP-Präparate von Brustkrebspatientinnen verstärkt SA-beta-Gal und Seneszenz-assoziierte Marker wie P16 und P53, während das umliegende gesunde Gewebe SA-beta-Gal negativ blieb<sup>134</sup>. Dies weist darauf hin, dass eventuell eine Sensibilisierung des Gewebes z.B. durch aktivierte Onkogene notwendig ist, um auf bestimmte Stimuli hin in Seneszenz zu gehen. In den unbehandelten Tumorproben fand man sporadisch SA-beta-Gal-positive Zellen von ca. 10 %. In einer anderen Studie zeigen zwei von drei Tumorbiopsien von Patienten mit Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nach Behandlung mit Carboplatin und Paclitaxel Seneszenzmarker, wohingegen die drei unbehandelten Tumorbiopsien SA-beta-Gal weitestgehend negativ waren<sup>129</sup>. Die Bedeutung von Seneszenz für den klinischen Verlauf über längere Zeiträume hinweg gesehen ist bisher noch unklar.

Zusammenfassend erklärt Abbildung 5, welche Rolle OIS und TIS entsprechend der aktuellen Literatur *in vivo* spielen könnte: Normale Zellen reagieren auf die Aktivierung eines Onkogens mit einer initialen Hyperproliferation. Durch die begleitende Hyperreplikation kommt es zu

einem DNS-Schaden, auf den die Zelle mit Seneszenz reagiert, der prämaligne Tumor arretiert in seinem Wachstum. Das Gewebe kann sich vor der Progression zum malignen Tumor schützen.



**Abbildung 5: Therapie-induzierte Seneszenz.** Rolle von Seneszenz in prämaligen und malignen Tumoren. Onkogenaktivierung in normalen Zellen führt zu einer initialen Hyperproliferation. Der hierbei entstehende DNS- Schaden schaltet ein Tumorsuppressorprogramm ein, was den prämaligen Tumor in seinem Wachstum arretieren lässt. Man findet typische Merkmale von Seneszenz. Kommt es zu einer Mutation, die das Tumorsuppressorprogramm ausschaltet, oder alternativ zu einer Abnahme der Seneszenz-begünstigenden Begleitfaktoren, beginnt der Tumor wieder zu wachsen, das invasive Malignom entsteht. Wird der maligne Tumor mit Chemotherapeutika behandelt, so wird er, im Falle des Ansprechens, in den Zellsuizid Apoptose oder wieder in den terminalen Zellzyklusarrest Seneszenz geführt.

Was während der Progression eines prämaligen Tumors in ein Karzinom molekularbiologisch genau passiert, ist unklar. Denkbar wäre einerseits das Auftreten einer Mutation des Effektor-

## Einleitung

Signalweges der Seneszenz-Maschinerie, z.B. einer *p53*-Mutation, womit der prämaligne Tumor beginnt unkontrolliert invasiv zu proliferieren. Ein alternatives Modell sieht Seneszenz in der prämaligen Läsion als einen Ausdruck von onkogener Aktivität gemeinsam mit weiteren Seneszenz-begünstigenden Faktoren. Zu diesen Faktoren könnten zell-autonome und möglicherweise lokale nicht zell-autonome Bedingungen zählen wie z.B. die Gefäßdichte, das Vorliegen einer Hypoxie und von Makrophagen sezernierte Zytokine. Der Progress in ein invasives Karzinom wird dann durch den geringeren pro-seneszenten Druck erklärt, der das Überwinden von OIS ermöglicht. Ein entscheidender Unterschied in diesem Modell ist, dass die Zellen genetisch Seneszenz-fähig bleiben. Im entstandenen malignen Tumor sind eventuell noch wenige kleine seneszente Areale zu finden. Behandelt man nun mit Chemotherapeutika, kann der Tumor im Falle eines Ansprechens auf die Therapie entweder wieder in Seneszenz arretieren oder in Apoptose gehen.

## **2 Fragestellung**

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht die Frage, ob und wann Seneszenz in der kolorektalen Adenom- Karzinomsequenz vorkommt und ob dies prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf Chemotherapie hat. Folgende Hypothesen, als Fragen formuliert, wurden im einzelnen untersucht:

### **1. Untersuchung von Seneszenz in Kryogeweben der kolorektalen Adenom-Karzinomsequenz**

Zeigen kolorektale Kryoadenome als Präkanzerosen, die einen jahrelangen Wachstumsarrest eingehen, Merkmale von Seneszenz?

Zeigen kolorektale Kryokarzinome als invasiv-proliferierende Malignome zumindest teilweise an einzelnen Stellen Merkmale von Seneszenz?

### **2. Untersuchung von Seneszenz in Paraffingeweben der kolorektalen Adenom-Karzinomsequenz**

Kann man Seneszenz durch die Zusammenschau mehrerer seneszenz-assoziiierter Marker im Sinne einer Seneszenz-Signatur in Paraffingeweben nachweisen?

### **3. Untersuchung der prädiktiven Relevanz von Seneszenz im kolorektalen Karzinom**

Bedeutet das Vorhandensein von sporadischen seneszenten Zellen in einem unbehandelten invasiven kolorektalen Karzinom, dass dieses durch Chemotherapeutika leichter in Therapie-induzierte Seneszenz zu bringen und dadurch ein besseres klinisches Ergebnis zu erwarten ist?

Zeigen also Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, in dem Hinweise auf sporadische senescente Zellen gefunden werden, ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie mit 5-FU als Patienten, in deren kolorektalem Karzinom keine Seneszenz vorhanden ist?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Laborchemikalien wurden von Merck (Deutschland), Biochrom (Deutschland), Sigma (Deutschland), Roth (Deutschland), Serva Electrophoresis (Deutschland), New England Biolabs (Deutschland), DAKO (Dänemark) und Gibco (USA) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Geräte und Zubehör, sowie Zellkulturmaterialien wurden von Falcon (Deutschland), Eppendorf (Deutschland), Nunc (Deutschland) und Techno Plastic Products (Schweiz) als sterile Einmalartikel bezogen. Wiederverwendbare Materialien wurden autoklaviert. Chemikalien und Materialien weiterer Hersteller sind in der folgenden Liste aufgestellt.

##### 3.1.1 Zelllinien und Bakterienlinie

IMR90	American Type Culture Collection (ATCC), USA (CCI-186) adhärente diploide humane Lungenfibroblasten eines 16 Wochen alten Fetus
Phoenix eco	Nolan Lab, USA <sup>135</sup> Adhärenz humane embryonale Nierenzelllinie 293T
E.coli (DH5 $\alpha$ )	Invitrogen, Deutschland

##### 3.1.2 Medien

Medium zur Zellkultivierung (bei 4 °C aufbewahren)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM + 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin + Pyruvat) + 10-15 % FBS + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium (bei 4 °C aufbewahren)	FBS (Fetales Kälberserum) + 10 % DMSO
Lysogeny broth (LB) -Medium	10 g/l Trypton + 5 g/l NaCl, (evtl. + Ampicillin)

### 3.1.3 Lösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) (bei RT aufbewahren)	8 g NaCl (137 mM) + 0,2 g KCl (2,7 mM) + 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10 mM) + 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2 mM) auf 800 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen; auf pH 7,4 titrieren auf 1 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
S1-Lösung (Mini-Präparation) (bei 4 °C aufbewahren)	50 mM Glukose + 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 10 mM EDTA (pH 8,0) in dH <sub>2</sub> O
P1-Lösung (Mini-Präparation) (bei 4 °C aufbewahren)	S1-Lösung + 100 µl/ml RNase A jeweils frisch hinzufügen
S2-Lösung (Mini-Präparation) (bei RT aufbewahren)	0,2 N NaOH + 1 % SDS in dH <sub>2</sub> O jedes Mal frisch ansetzen
S3-Lösung (Mini-Präparation) (aufbewahren bei 4 °C)	60 ml 5 M Kaliumacetat + 11,5 ml Essigsäure + 28,5 ml dH <sub>2</sub> O
50 x TAE (bei RT aufbewahren)	242 g Trisbase + 57,1 ml Eisessig + 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
SA-beta-Gal-PBS (bei RT aufbewahren)	PBS + 1 mM MgCl <sub>2</sub> titriert auf pH 6 für humane Gewebe
SA-beta-Gal-Fixativ	SA-beta-Gal-PBS + 2 % Paraformaldehyd + 0,25 % Glutaraldehyd



## Material und Methoden

X-Gal-Lösung	SA-beta-Gal-PBS + 1 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid + 50 $\mu$ l/ml 20 x Kaliumzyanidlösung
20 x Kaliumzyanidlösung (bei 4 °C aufbewahren)	820 mg $K_3Fe(CN)_6$ + 1,050 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ auf 25 ml mit PBS auffüllen
Mowiol 4-88 (Aliquots bei -20 °C aufbewahren, vor Verwendung auf 37 °C vorwärmen)	8 g Mowiol + 40 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) bei 50-60 °C vermischen; nach dem Abkühlen: +20 ml Glycerol +2,5 % DABCO
QIAamp DNS Mini Kit	Quiagen, Germany
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	3130 Genetic Analyzer, Biosystems, USA

### 3.1.4 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Backbone</b>	<b>Insert</b>	<b>Herkunft</b>
pBABE-Ras	pBABE-puro	H-rasV12	Scott Lowe
pBABE-empty	pBABE-puro	-	Scott Lowe

### 3.1.5 Geräte und Zubehör

BioPhotometer 8,5 mm	Eppendorf, Deutschland
Durchflußzytometer (Fluorescence activated cell sorting, FACS) FACSCalibur	Becton Dickinson, Deutschland
Einbettgerät EG1160	Leica, Deutschland

## Material und Methoden

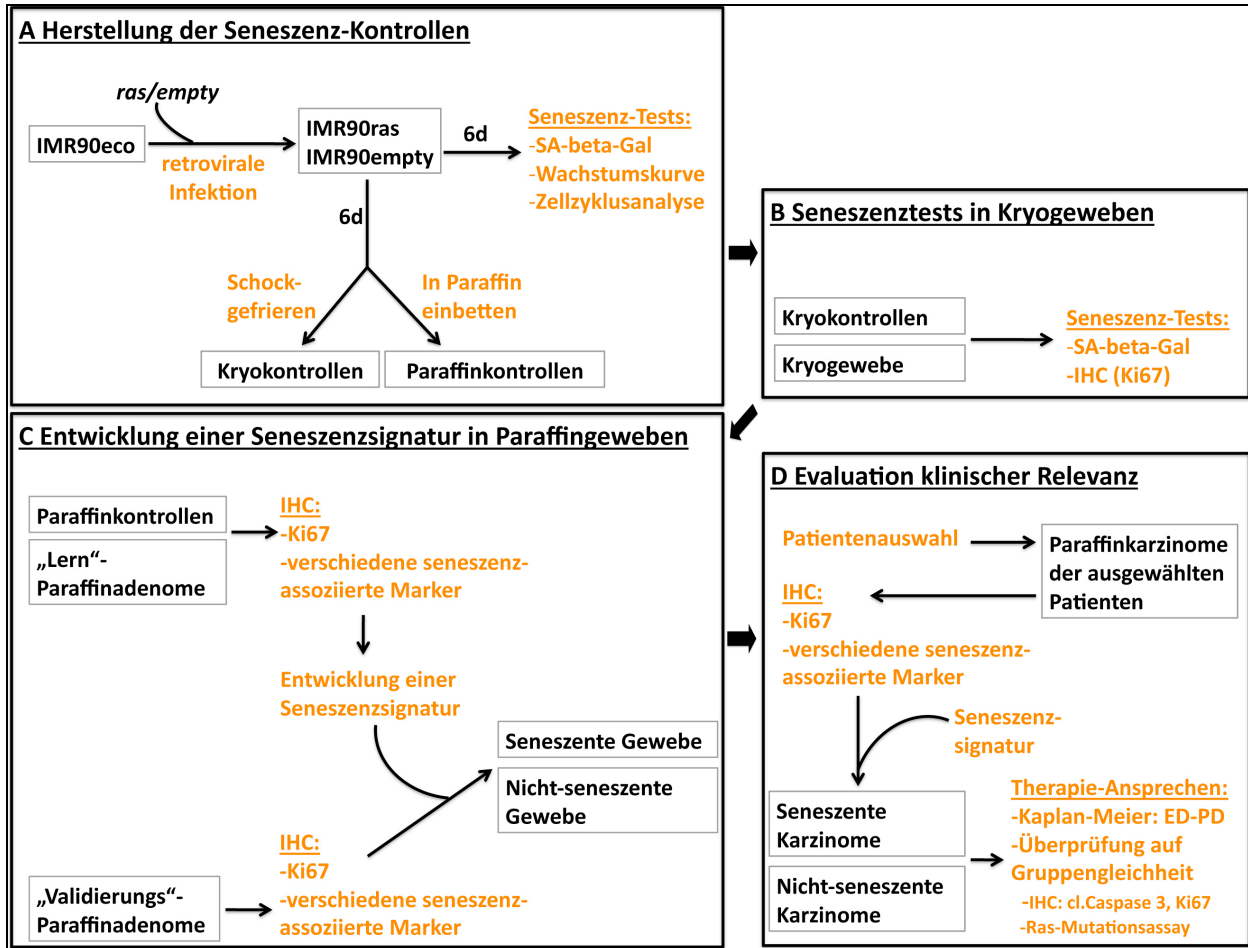
Elektrophorese Power Supply E835	Consort, Belgien
Entwässerungsgerät ASP300	Leica, Deutschland
Inkubator Steri-cult 200	Labotect GmbH, Deutschland
Invisorb Plasmid Maxikit	Invitek, Deutschland
Kamera	Inteq, Deutschland
Kryostat FrigoCut 2800	Reicher-Jung, Deutschland
Microtom RM2035	Leica, Deutschland
Mikroskop	Krüss Optronic, Deutschland
Mikroskop für Fluoreszenzfärbungen	Zeiss Axioplan
Mr. Frosty Einfrierbox (1° C pro Minute)	Nalgene Labware
Neubauer-Zählkammer improved Tiefe 0,1 mm	Superior Marienfeld, Deutschland
Paraffinkassetten	Medite, Deutschland
Sterilbank Kendro HeraSafe	Heraeus, Deutschland
Stickstofftank Thermolyne 6Plus Locator	Thermo Scientific, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Wärmeschrank Function Line	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus, Deutschland

### 3.1.6 Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Firma</b>
cleaved caspase 3/ Asp175	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA (#9661)
H3K9me <sup>3</sup>	Kaninchen	Abcam, USA (ab8898)
HP1 $\gamma$	Maus	Chemicon, USA (MAB3450)
Ki67	Maus	DAKO, Dänemark (M7240)
P16	Maus	Novocastra, UK (NCL-p16-432)
P53	Maus	Oncogene, Deutschland (OP43, AB-6)
PAI-1	Maus	Novocastra, UK (Ncl-PAI-1)
Phospho-Chk2 (Thr68)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA (#2661)
Phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA (#4376)
Phospho-H2A.x (Ser139)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA (#2577)
Phospho-P53 (Ser15)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA (#9284)
PML	Maus	DAKO, Dänemark (M7202)
Fluoreszenz-Sekundärantikörper Anti-Maus IgG	Ziege	GIBCO Invitrogen, Deutschland, (Alexa Fluor 594; A21121)
Fluoreszenz-Anti-BrdU	Maus	GIBCO Invitrogen, Deutschland (MD5300)
Anti-Kaninchen-Zweitantikörper	Esel	Dianova, Deutschland
LSAB-AP Kit		Dako, Dänemark (K0689)
LSAB-HRP Kit		Dako, Dänemark (K0690)

### 3.2 Methoden

Zur Übersicht des Versuchsaufbaus und des zeitlichen Ablaufes der einzelnen Schritte dient Abbildung 6.



**Abbildung 6: Methodenübersicht.** Übersicht der Einzelschritte der Experimente. Arbeitsschritt A: Herstellung von Kontrollen für den seneszenten Phänotyp aus IMR90 Fibroblasten. IMR90 wurden mit *ras*- oder *empty*-Vektor retroviral infiziert. Nach dem Ende der Selektion wurden sie sechs Tage lang in Kultur belassen. Während dieser Zeit zeigte sich der seneszente Phänotyp der IMR90ras, wohingegen die IMR90empty weiter proliferierten. Es wurden verschiedene Seneszenztests wie Wachstumskurven, SA-beta-Gal-Assay und eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden als Zellpellets entweder für Kryokontrollen schockgefroren oder für Paraffinkontrollen entwässert und in Paraffin eingebettet. Arbeitsschritt B: IMR90-Kryokontrollen und kolorektale Kryogewebe (5 Normalgewebe, 12 Adenome, 6 Karzinome) wurden mit SA-beta-Gal-Assay und immunhistochemischem Nachweis von Ki67 auf Seneszenz untersucht. Arbeitsschritt C: IMR90-Paraffin-

kontrollen und Paraffinadenome wurden immunhistochemisch auf Ki67 und verschiedene Seneszenz-relevante Marker gefärbt. Daraus wurde eine Seneszenz-Signatur ermittelt, die der Klassifizierung von Geweben in seneszent und nicht-seneszent dient. Die Signatur wurde an weiteren Paraffinadenomen validiert, zu denen teilweise auch die korrelierenden Kryogewebe vorhanden waren und auf Seneszenz untersucht wurden. Arbeitsschritt D: Zur Untersuchung der klinischen Relevanz von Seneszenz in kolorektalen Karzinomen wurden Patienten im UICC Stadium IV mit 5-FU/LV als first line Chemotherapie ausgewählt. Die Paraffinkarzinome, die aus der Tumoresektion vor Beginn der Chemotherapie stammten, wurden auf die Signatur-relevanten Marker gefärbt und durch die Seneszenz-Signatur in seneszenzente und nicht-seneszenzente Gewebe eingeteilt. Der Seneszenzstatus wurde mit dem klinischen Ansprechen auf Chemotherapie (Progressionsfreies Überleben als Zeitdauer von Erstdiagnose bis Krankheitsprogression nach Beginn der Chemotherapie) korreliert. Es folgte eine Prüfung auf Gruppengleichheit zwischen seneszentem und nicht-seneszentem Kollektiv bezüglich mehrerer klinischer Parameter und auch bezüglich der Apoptose- und Proliferationsrate und des *K-ras*-Mutationsstatus.

### 3.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien unter einer sterilen S 1-Werkbank durchgeführt.

#### 3.2.1.1 Zelllinien

Als retrovirale Verpackungszelllinie dienten Phoenix eco, eine Nierenzelllinie, die stabil die retroviralen Strukturgene für die Gag-Pol-Proteine exprimiert (*gag* kodiert Kapsidproteine, *pol* die reverse Transkriptase). Charakteristisch ist eine hohe Transfektionseffizienz mit der Calcium-Phosphat-Methode. Phoenix-Zellen mit dem ecotropen Hüllplasmid erzeugen nicht-replikations-kompetente rekombinante Retroviren, die nur ecotrope Wirte (murine Zellen) infizieren können. Die Zellen wurden bis Passage 17 verwendet. Die humane Fibroblastenzelllinie IMR90 mit einem stabil retroviral infizierten eco-Rezeptor (IMR90eco) wurde maximal bis zur 50 fachen Verdopplung ihrer Zellzahl verwendet<sup>136</sup>. Durch den eco-Rezeptor können die IMR90 auch als humane Zelllinie von den Retroviren der Phoenix eco infiziert werden. Alle verwendeten Zelllinien sind adhärenz.

### *3.2.1.2 Subkultivierung der Zelllinien*

Phoenix wurden in Zellkulturschalen in Kultivierungsmedium mit 10 % FBS unter Standardbedingungen (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Für IMR90 wurde bei sonst gleichen Bedingungen Kultivierungsmedium mit 15 % FBS verwendet. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und für 3-5 min bei 37 °C mit 1 ml Trypsin-EDTA von der Kulturplatte gelöst. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde durch Verdünnung mit Kultivierungsmedium beendet. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in frischem Wachstumsmedium in der gewünschten Dichte (1:3 bis 1:15) in neuen Zellkulturschalen ausgebracht.

### *3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen*

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert. DMSO verhindert die Kristallbildung im Inneren der Zellen. Diese Suspension wurde auf 1 ml Kryoröhrchen verteilt, die im „Mr. Frosty“ bei -80 °C über Nacht aufbewahrt und dann in N<sub>2</sub> (l) bei -196 °C gelagert wurden.

Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen möglichst schnell auf 37 °C aufgewärmt, in Kultivierungsmedium suspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Wachstumsmedium in eine 10 cm Zellkulturplatte ausgebracht.

### *3.2.1.4 Zellzahl, Wachstumskurven, Viabilität*

Die Trypanblaumethode basiert auf der Undurchlässigkeit vitaler Zellmembranen für den Farbstoff Trypanblau, so dass tote Zellen im Gegensatz zu Vitalen blau erscheinen. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und in Kultivierungsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 0,2 % Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 vermischt. Nach 1 min Inkubation wurde 10 µl dieser Mischung in der Neubauer-Zählkammer in den 16 Quadranten der vier großen Eckquadrate ausgezählt. Während des Zählens wurden die übrigen Proben auf Eis gelagert. Die Zellzahl berechnet sich nach Gleichung 1, die Viabilität nach Gleichung 2:

$$\text{Gleichung 1:} \quad \text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \frac{Z_{gez}}{\text{gezählteQuadrate}} \times 10^4 \times \text{Vol}$$

$$\text{Gleichung 2:} \quad \text{Viabilität [\%]} = \frac{Z_{gez} - Z_{tot}}{Z_{gez}} \times 100 ,$$

wobei gilt:  $Z_{gez}$ = gezählte Zellen,  $Z_{tot}$ = gezählte blauegefärbte Zellen, Vol= Gesamtvolumen der Zellschlösung,  $10^4$ = Kammerfaktor.

Die Prozentwerte der Viabilität zeigen die lebenden Zellen im Verhältnis zu den gezählten Zellen. Werte für Wachstumskurven wurden jeweils aus drei voneinander unabhängigen Versuchen bestimmt.

### 3.2.2 Retrovirale Infektion

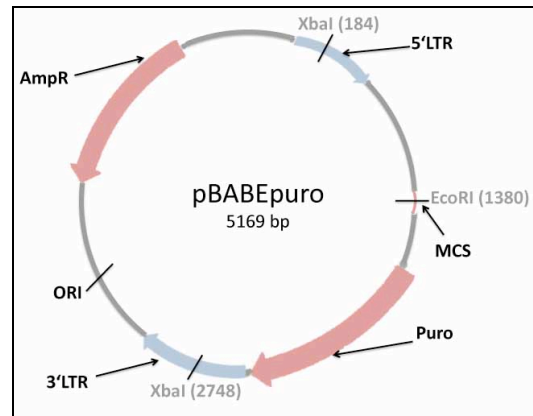
#### 3.2.2.1 verwendete Plasmide

Die Plasmide pBABE-puro-rasV12 und pBABE-puro-empty kodieren eine Puromycin-Resistenz, die bei der anschließenden Antibiotika-Selektion dafür sorgt, dass nur die erfolgreich infizierten Zellen überleben (Abbildung 7). Das ecotrope Helferplasmid kodiert für gag und pol und dient der Erhöhung der Infektionseffizienz.

#### 3.2.2.1 Transformation

Rekombinante Plasmide wurden in E.coli-Zellen vermehrt, die für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht wurden. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Mit jeweils  $100\text{ }\mu\text{l}$  Zellen wurden  $1\text{ }\mu\text{l}$  der gewünschten Plasmid-DNS in  $10\text{ }\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O vermischt. Nach der Inkubationszeit (10 min auf Eis) wurden die Bakterien einem Hitzeschock (90 s,  $42\text{ °C}$ ) ausgesetzt. Nach sofortigem Abkühlen (2 min auf Eis) wurde jeweils 1 ml vorgewärmtes LB Medium ohne Ampicillin hinzugegeben. Diese Ansätze wurden schüttelnd inkubiert (1 h,  $37\text{ °C}$ ). Nach Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, RT) wurde der Überstand bis auf  $100\text{ }\mu\text{l}$  verworfen. In den verbleibenden  $100\text{ }\mu\text{l}$  wurden die Pellets resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausplattiert. Während der

Inkubation (über Nacht, 37 °C) formierten sich Kolonien. Die Platten wurden bis zur Verwendung der Kolonien maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt.



**Abbildung 7: Vektorkarte pBABE puro.** Puro und AmpR sind die Antibiotikaresistenzkodierenden Sequenzen. An der Multiplen Cloning Site (MCS) ist beim pBABEpuro-ras-Vektor die H-rasV12-Sequenz eingefügt. XbaI und EcoRI sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. ORI entspricht dem Replikationsursprung. 3'LTR bzw. 5'LTR (Long Terminal Repeat) sind verantwortlich für die Integration der cDNS-Kopien ins Wirtsgenom. (modifiziert aus [www.addgene.org](http://www.addgene.org)<sup>137</sup>)

### 3.2.2.2 Mini- Präparation der DNS

Mit der Mini-Präparation stellt man sicher, dass die transformierten Bakterienkolonien die gewünschte Plasmid-DNS beinhalten, bevor man anschließend in einer Maxi-Präparation größere und reinere Mengen desselben Plasmids herstellt.

Jeweils 2 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C im Bakterienschüttler bei 180 rpm). 1,5 ml dieser Kultur wurde in einem neuen Eppendorfgefäß bei 14000 rpm zentrifugiert (5 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl kalter P1-Lösung resuspendiert. Hierzu wurden 200 µl frische S2-Lösung gegeben und vorsichtig umgeschwenkt. Der Inhalt veränderte sich bei dieser alkalischen Lyse mit NaOH/ SDS von milchig zu klar. Es kommt hierbei zur Denaturierung der bakteriellen Proteine und der DNS. Nach der Inkubation (5 min, auf Eis) wurde je 150 µl S3-Lösung zur Neutralisierung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Plasmid-DNS renaturiert und alle anderen makromolekularen Komponenten



präzipitieren, was sich als weißer Niederschlag zeigt. Nach Inkubation (5-30 min, auf Eis) und Abzentrifugieren (14000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig in ein neues mit 1 ml kaltem 100 % igem Ethanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt und gemischt. Bei diesem Schritt fällt die Plasmid-DNS aus. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand abgesaugt, jeweils 1 ml kalter 70 % iger Ethanol zur Salzentfernung hinzugegeben, zweimal zentrifugiert (je 5 min, 14000 rpm, 4 °C) und jeweils der Überstand abgesaugt. Die gefällte DNS wurde bei 37 °C inkubiert bis der Ethanol vollständig verdampft war. Die DNS wurde in je 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

### *3.2.2.1 Maxi-Präparation der DNS*

Die Maxi-Präparation dient der Gewinnung größerer Mengen möglichst reiner Plasmid-DNS. Zur Kultivierung wurden die Reste der Mini-Präparationskulturen mit jeweils 200 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C im Bakterenschüttler bei 180 rpm inkubiert. Die Präparation erfolgte mit dem Invisorb Plasmid Maxi Kit von Invitex entsprechend des mitgelieferten Protokolls.

### *3.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration der DNS-Lösung*

Mit Hilfe eines Photometers kann durch die Messung der Extinktion die Reinheit und die Konzentration der einsträngigen Plasmid-DNS der Mini- oder Maxi-Präparation bestimmt werden. Das Maximum der Absorption der Purin- und Pyrimidin-Basen der DNS liegt bei ca. 260 nm. Die Extinktionskoeffizienten von Doppelstrang-DNS und Einzelstrang-DNS unterscheiden sich auf Grund der unterschiedlichen Basenstapelung. Bei 280 nm absorbieren aromatische Reste von Proteinen, so dass ein  $E_{250}/E_{280}$ -Verhältnis im Bereich von 1,8 bis 2,0 als Indikator für relativ geringe Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol gilt. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte mit einem programmierbaren Photometer von Eppendorf. Zuerst wurde ein Leerwert mit 100 µl dH<sub>2</sub>O bestimmt. Anschließend wurden jeweils 1 µl Plasmidlösung mit 99 µl dH<sub>2</sub>O gemessen, wovon der Leerwert abgezogen wurde.

### 3.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten

Sowohl nach Mini- als auch nach Maxi-Präparation wurde die gewonnene Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel sichtbar gemacht, um anhand der Anzahl und Größe der Fragmente sicher zu stellen, dass es sich um die gewünschte Plasmid-DNS handelt.

Zum Restriktionsverdau wurden je 3 µg Plasmid-DNS zusammen mit den Restriktionsenzymen (1 µl EcoRI, 2 µl XbaI, 1 µl BSA, 2 µl Puffer, aufgefüllt auf 20 µl mit dH<sub>2</sub>O) für 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1 x TAE in 1-2 % iger Konzentration aufgelöst und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Nach Abkühlen auf 60 °C und Zugabe von 10 ng/ml Ethidiumbromid wurde das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach 15 min war das Gel polymerisiert. Die Gelkammer wurde in die Laufkammer gesetzt und mit 1 x TAE als Laufpuffer aufgefüllt. Die verdauten DNS-Proben in Ladepuffer wurden in die Geltaschen geladen. Daneben wurden die DNS-Marker gefüllt, mit denen die Länge der DNS-Fragmente bestimmt werden konnte. Es wurde 45 min lang eine Spannung von 100-160 V angelegt. Die DNS konnte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3.2.2.4 Transduktion

#### 3.2.2.4.1 Calciumphosphat vermittelte Transfektion

Um die Entstehung replikationskompetenter Wildtyp-Viren aus dem verwendeten rekombinanten Retrovirus zu verhindern, werden sogenannte Verpackungszelllinien (hier Phoenix eco) verwendet. Diese können alle retroviralen Proteine synthetisieren, aufgrund einer Deletion im Verpackungssignal des retroviralen Genoms aber keine verpackungsfähige retrovirale Wildtyp-RNS. Die zu transfizierende Plasmid-DNS enthält cDNS-Information für verpackungsfähige RNS, aber keine kodierenden Sequenzen der viralen Proteine. Nach Transfektion wird die cDNS in RNS transkribiert, so dass nun retrovirale Partikel gebildet werden, die infizieren können, aber sich nicht selbst replizieren.

Phoenixzellen wurden in einer Konfluenz von ca. 30 % am Vortag in 10 cm Zellkulturplatten mit 10 ml Kultivierungsmedium ausgesät. Für jede 10 cm Platte wurden in einem FACS-Röhrchen 20 µg des gewünschten Plasmids, 15 µg Helferplasmid und 62,5 µg 2 M CaCl<sub>2</sub> mit sterilem

Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Während kontinuierlich mit einer Glaspipette Luft direkt in die Lösung geblasen wurde, wurde tropfenweise 500 µl 2-fach HBS hinzugegeben. Während der Inkubation (5 min, RT) bildete sich ein Plasmidpräzipitat. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde jeweils 25 µM Chloroquin auf die Phoenixplatten gegeben. Chloroquin inhibiert lysosomale DNAsen. Anschließend wurde das Plasmidpräzipitat tropfenweise hinzugefügt und durch vorsichtiges Schwenken mit dem Medium vermischt. Nach der Inkubation (12 h, 37 °C) wurde das Medium verworfen und mit 4 ml frischem Medium ersetzt. Dadurch wurde die Transfektion gestoppt.

### *3.2.2.4.2 Infektion der Zielzellen*

Mit den bei der Transfektion gewonnenen rekombinanten Retroviren wurden die am Vortag ausgesäten Zielzellen (IMR90eco) (Konfluenz 70 %, 6-Well-Platten) infiziert. Dazu wurde das Medium der Zielzellen verworfen und der Virusüberstand der Phoenixplatten nach 24 h durch 0,45 µm Filter so auf die Zielzellen verteilt, dass auf jede Schale 1 ml Überstand kommt. In den Überstand wurden 4 µg/ml Polybren als Infektionsverstärker gegeben. Die Phoenixplatten wurden wieder mit je 4 ml neuem Medium aufgefüllt. Nach weiteren 12 h wurde dieser Überstand nach Filtration wieder auf die Zielzellen verteilt. Die Zielzellen wurden bei 1400 rpm bei 32 °C 10 min lang spinokuliert. Diese beiden Infektionsschritte mit Spinokulation wurden nach weiteren 12 h wiederholt. Zwölf Stunden nach Abschluß der Infektion wurde das Medium erneuert.

Über die Koexpression der Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin konnte der Infektionserfolg anschließend kontrolliert werden. Dazu wurde für 4 Tage mit 2,5 µg/ml Puromycin selektiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen derselben Zelllinie (IMR90eco). Nach der Selektion wurden die überlebenden Zellen trypsinisiert und auf neuen Platten ausgesät.

### *3.2.3 Fixieren und Paraffineinbettung der Kontrollen*

Sechs Tage nach der Infektion zeigte sich der jeweilige Phänotyp und die Zellen wurden zur Herstellung der Kontrollen weiter verarbeitet. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 min) und der Überstand wurde abgesaugt. Zur Herstellung der Kryokontrollen wurde das

## Material und Methoden

Pellet in einem Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C. Zur Herstellung der Paraffinkontrollen wurde das Zellpellet in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben und in 1 ml 98 % igem Ethanol durch Vortexen aufgelöst. Die Lösung wurde zentrifugiert (1000 rpm, 30 s), der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde mit Hilfe eines Spatels in einem Filterpapier eingewickelt und in die Einbettkassette gelegt. Die Kassetten wurden für 10-12 h in 10 % igem Formalin fixiert. Danach erfolgte das Entwässern und Einbetten in Paraffin mit den Entwässerungs- und Einbettgeräten von Leica analog dem Prozess, der in der Pathologie mit den Patientenproben durchgeführt wird. Dieser Prozess läuft über mehrere Schritte unter Vakuum (Tabelle 1).

<b>Schritt</b>	1	2	3 + 4	5	6	7	8	9 - 11
<b>Chemikalie</b>	Ethanol 70 %	Ethanol 70 %	Ethanol 96 %	Ethanol absolut	Ethanol/ Xylol 2:1	Ethanol/ Xylol 1:2	Xylen	Paraffin- wachs
<b>T (°C)</b>	45	40	40	40	40	40	40	60
<b>Dauer (min)</b>	60	40	2 x 15	30	30	30	15	3 x 30

**Tabelle 1: Paraffineinbettung.** Übersicht der Schritte zur Entwässerung für IMR90-Pellets im Entwässerungsgerät ASP300 von Leica. Es handelt sich um dasselbe Programm, das zur Entwässerung der Patientenproben in der Pathologie verwendet wird.

Von den Gewebeproben wurden genauso wie von den Kontrollen entweder 12 µm-Schnitte mit einem Kryostat (schockgefrorene Proben) hergestellt oder 7 µm-Schnitte mit einem Mikrotom (Paraffinproben).<sup>A</sup> Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 50 °C abgeschmolzen bevor sie gefärbt wurden.

---

<sup>A</sup> Das Entwässern und Einbetten in Paraffin, sowie das Schneiden der Paraffinblöcke wurde von Gabriele Fernahl durchgeführt.

### 3.2.4 Färbemethoden

#### 3.2.4.1 Immunhistochemie

Mit immunhistochemischen Verfahren lassen sich Antigene in Zellen oder Gewebeschnitten nachweisen. Dazu wird das Antigen mit einem Primärantikörper markiert. Ein enzymgekoppelter Zweitantikörper bindet an das F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers und verstärkt das Signal. Anschließend wird das gekoppelte Enzym in einer Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht. Für Immunfärbungen von einzelnen Zellen wurde die eben beschriebene Methode verwendet. In Gewebeschnitten wurde die Antigenmarkierung durch die Labelled-Streptavidin-Biotin-(LSAB)-Methode weiter verstärkt. Dabei bindet der Sekundärantikörper an Biotin. Mit Alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (HRP) markiertes Streptavidin bindet im Folgeschritt an das Biotin des Sekundärantikörpers. Dieser Verstärkungsschritt kann gegebenenfalls auch wiederholt werden.

Paraffin-eingebettete Gewebe müssen vor der Färbung in der absteigenden Reihe entparaffiniert und hydratisiert werden. Dazu durchliefen sie für jeweils 5 min verschiedene Schritte von Xylol über 98 % Ethanol, 70 % Ethanol zu dH<sub>2</sub>O. Darauf folgt ein Antigen-Demaskierungsschritt, der durch 5 minütiges Kochen im Schnellkochtopf mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt wurde. Anschließend wurde mit Primär- und Sekundärantikörper entsprechend der in Tabelle 2 beschriebenen Bedingungen gefärbt. Zwischen jedem Schritt wurde mit TBS (3 mal, 5 min) gewaschen. Zum Abschluss wurde bei allen Schnitten eine Kernfärbung durchgeführt. Diese hilft beim Erkennen der Strukturen des Gewebes. Hierzu wurden die Schnitte 5 min mit Hämalaun inkubiert und anschließend 5 min in warmem Leitungswasser gebläut. Die Proben wurden nach der immunhistochemischen Färbung mit Aquatex eingedeckelt.<sup>A</sup>

Für die Ki67-Färbung an Kryoschnitten wurden die Schnitte mehrere Stunden an Luft getrocknet. Nach der Fixierung in Aceton (10 min) wurde mit TBS (3 mal, 5 min) gewaschen und ohne Demaskierung mit dem Primär- und Sekundärantikörper entsprechend Tabelle 2 gefärbt.

---

<sup>A</sup> Die immunhistochemischen Färbungen der Paraffingewebe wurden teilweise mit Hilfe von Ines Schildhauer durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung auf cleaved Caspase 3 wurde durch Simone Spieckermann durchgeführt.

## Material und Methoden

<b>Antigen</b>	<b>Demaskierung</b>	<b>Primär-AK</b>	<b>Kit für Sekundär-AK-Schritte</b>	<b>Chromogen</b>
<b>Cl.casp.3</b> (Asp 175)	5' Citratpuffer	30'; 1:200	Esel Anti-Kaninchen Zweitantikörper 15', dann LSAB-AP: 15' Streptavidin- AP	10'Fast Red-Chromogen
<b>H3K9me<sup>3</sup></b>	5' Citratpuffer	30'; 1:250	LSAB-AP: 15'Link, 15' Streptavidin-AP	20'Fuchsin-Chromogen
<b>HP1 <math>\gamma</math></b>	5' Citratpuffer	30'; 1:250	LSAB-AP: 15'Link, 15' Streptavidin-AP	10'Fuchsin-Chromogen
<b>Ki67</b>	5' Citratpuffer	30'; 1:250	LSAB-AP: 15'Link, 15' Streptavidin-AP	10'Fuchsin-Chromogen + 1 Tropfen/ml Levamisol
<b>p-Chk2</b> (Thr68)	5' Citratpuffer	30'; 1:100	LSAB-AP: 30'Link, 30' Streptavidin-AP	20'Fuchsin-Chromogen
<b>p-Erk 1/2</b> (Thr202/ Tyr204)	5' Citratpuffer	30'; 1:50	LSAB-AP: 30'Link, 30' Streptavidin-AP	30' Fuchsin-Chromogen
<b>p-H<sub>2</sub>A.x</b> (Ser139)	5' Citratpuffer	30'; 1:200	LSAB-AP: 30'Link, 30' Streptavidin-AP	15'Fuchsin-Chromogen
<b>p-P53</b> (Ser15)	5' Citratpuffer	30'; 1:50	LSAB-AP: 30'Link, 30' Streptavidin-AP	15'Fuchsin-Chromogen
<b>P16</b>	5' Citratpuffer	60'; 1:20	DAB-Kit: 30' LösungA, 30' LösungB	15' SigmaFAST-DAB
<b>P53</b>	5' Citratpuffer	30'; 1:50	LSAB-AP: 15'Link, 15' Streptavidin-AP	10'Fuchsin-Chromogen
<b>PAI-1</b>	5' Citratpuffer; 10' Peroxidase-block	30'; 1:20	LSAB-HRP: 15'Link, 15' Streptavidin-HRP	10'DAB-Chromogen
<b>PML</b>	5' alkalischer Puffer	30'; 1:50	LSAB-AP: 30'Link, 30' Streptavidin-AP, 10'Link, 10' Streptavidin-AP	30'Fuchsin-Chromogen

**Tabelle 2: Immunhistochemische Färbungen.** Bedingungen für immunhistochemische Färbungen von Paraffingeweben.

### 3.2.4.2 Fluoreszenzfärbung der SAHF

Für immunzytochemische Färbungen wurden die gewünschten Zellen direkt auf in die Kulturschalen eingelegten sterilen Deckgläschen kultiviert und auf diesen fixiert und gefärbt. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden fixiert (15 min, Histofix) und für 20 min permeabilisiert (0,1 % TritonX100 in PBS). Der H3K9me<sup>3</sup>-Antikörper wurde über Nacht inkubiert (4 °C, 1:500 in PBS). Als Zweitantikörper wurde ein Fluoreszenz-konjugierter Anti-Kaninchen-AK (2 h, 1:600 in PBS, RT) verwendet. Als Kernfärbung wurde mit DiAmidinoPhenylIndol (DAPI) gegengefärbt (10 min, 1 µg/ml DAPI in dH<sub>2</sub>O, RT), einem Fluoreszenzfarbstoff (blaue Emission bei 461 nm), der zwischen zwei DNS-Stränge interkaliert und dadurch die Zellkerne darstellt. Zwischen den Schritten wurde mit PBS gewaschen (3 mal, 1 min). Die mit Mowiol eingedeckelten Fluoreszenzfärbungen wurden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt und konnten im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

### 3.2.4.3 SA-beta-Gal-Färbung

Die Seneszenz-assoziierte (SA)-beta-Galactose-(Gal)-Färbung bei einem definierten pH-Wert ist der Standard-Assay zum Nachweis seneszenter Zellen<sup>67</sup>. In seneszenten Zellen ist die Expression oder Aktivität der sauren lysosomalen beta-Galaktosidase erhöht. Dies führt zu einer residuellen lysosomalen Aktivität bei einem suboptimalen pH und zeigt sich in einem blauen zytosolischen Präzipitat.

Verwendet wurden Kryogewebeschnitte oder auf Deckgläschen kultivierte Zellen, da SA-beta-Gal nur an nativen Zellen oder Geweben nachgewiesen werden kann. Diese wurden zuerst in frisch zubereitetem SA-beta-Gal-Fixativ fixiert (10 min, RT), gewaschen (3 mal, 1 min, in SA-beta-Gal-PBS) und in einer dunklen Feuchtkammer mit frisch zubereiteter X-Gal-Lösung inkubiert (37 °C). X-Gal ist ein chromogenes Substrat der Beta-Galaktosidase. Die Inkubationszeit variierte je nach Zell- bzw. Gewebeart zwischen 2 h und 12 h und wurde anhand von Kontrollgeweben (IMR90empty, IMR90ras) bestimmt. Nach drei Waschvorgängen (mit SA-beta-Gal-PBS, je 1 min) werden die Proben mit Mowiol (bei Zellen) oder Aquatex (bei Geweben) eingedeckelt und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### 3.2.4.4 Auswertung der Gewebefärbungen

Bei den Kryogeweben wurden für jede Probe an fünf zufällig ermittelten Ki67 ausgezählt. Die hierzu korrespondierenden Stellen wurden auf den Schnitten des SA-beta-Gal-Assays aufgesucht und ausgezählt. Dazu wurden mindestens 100 Epithelzellen pro Stelle mit Hilfe des Zellzählers ausgezählt. Als positiv gewertet wurden nukleär gefärbte Zellen bei den Ki67-Färbungen und perinukleär gefärbte Zellen bei der SA-beta-Gal-Färbung. Aus diesen Daten wurden der Mittelwert, sowie der Maximal- und Minimalwert für jede Probe berechnet. Als seneszent gewertet wurden Gewebe, die über die Mittelwerte verglichen eine stärkere SA-beta-Gal-Färbung als Ki67-Färbung aufwiesen.

Bei den Paraffingeweben wurde hierzu analog die Ki67-Färbung an fünf repräsentativ gewählten Stellen ausgezählt, wobei hier darauf geachtet wurde, auch eventuell vorhandene niedrig-proliferierende Areale mit in die Auszählung einzuschließen. Von diesen fünf Stellen wurde die am geringsten Ki67-gefärbte Stelle für die Auswertung der weiteren Seneszenz-assoziierten Marker herangezogen. Es wurden jeweils an diesem gering Ki67-gefärbten Areal ebenfalls mindestens 100 Epithelzellen mit dem Zellzähler ausgezählt. Als positiv wurden bei der PAI-1-Färbung nur zytoplasmatisch gefärbte Zellen gewertet, bei allen anderen Färbungen nur nukleär gefärbte Zellen. Die Klassifikation als seneszent oder nicht-seneszent Areal erfolgte mit Hilfe des Seneszenzindex. Die Ermittlung dieses Index wird im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

### 3.2.5 Durchflußzytometrische Messungen: BrdU-PI-Profil

Der Zellzyklus besteht aus verschiedenen Phasen, die sich u.a. durch einen unterschiedlichen DNS-Gehalt und unterschiedliche DNS-Syntheseaktivität auszeichnen. Während der Ruhephase G<sub>0</sub> und der präsynthetischen G<sub>1</sub>-Phase enthalten die Zellen einen diploiden Chromosomensatz. Während der Synthese (S)-Phase findet die DNS-Verdopplung, die Replikation, statt. Darauf folgt die postsynthetische G<sub>2</sub>-Phase mit dem doppelten Chromosomensatz. Während der kurzen Teilungsphase M werden die Chromosomen auf zwei Tochterzellen aufgeteilt.

Propidiumiodid (PI) interkaliert nach Permeabilisation der Zellmembran zwischen zwei DNS-Stränge, es entspricht also in einem genauen stöchiometrischen Verhältnis der Menge der DNS der Zellen. In der G<sub>1</sub>-Phase entspricht der DNA-Gehalt 1 N, in der G<sub>2</sub>/M Phase 2 N und während der S-Phase liegt der Gehalt zwischen 1 und 2 N. 5-Brom-2-desoxy-Uridin (BrdU) ist



modifiziertes Uridin, das den Zellen in Kultur zugegeben wird und während der DNS-Synthese statt Thymidin in die DNS eingebaut wird. Durch Markierung mit einem Fluoreszenzgekoppelten Antikörper kann es anschließend nachgewiesen werden. Dadurch wird also DNS-Synthese gezeigt. Mit BrdU und PI kann die Verteilung der Zellen im Zellzyklus angezeigt werden. Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (Fluorescence activated cell sorting, FACS) und der Software CellQuest und Modfit wird die Fluoreszenzaktivität der suspendierten Zellen gemessen und quantifiziert. Dabei werden die Zellen mit einer Kapillare angesaugt und passieren einzeln verschiedenfarbige Laser, die das von den Zellen ausgesendete Streulicht sowie Fluoreszenzimpulse der markierten Antikörper detektieren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 75 % mit 10 µM BrdU inkubiert (2 h, 37 °C). Nach dem Trypsinieren und Waschen mit PBS wurden Aliquots von 10<sup>6</sup> Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mit 900 µl 70 % igem Ethanol fixiert (über Nacht, 4 °C). Die Proben wurden wieder mit PBS gewaschen und in 318 µl Pepsinlösung (2 mg/ml Pepsin in 2 normaler Salzsäure) resuspendiert. Nach der Inkubationszeit (20 min, 37 °C) wurde die Lösung mit 682 µl einmolarer Trisbase neutralisiert und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Das Pellet wird in 100 µl PBS mit Fluoreszenz-markiertem Anti-BrdU-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 resuspendiert und inkubiert (30 min, RT, im Dunkeln). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird jeder Probe 200 µl PBS mit 4 µg PI und 40 µg RNase A hinzugefügt. Nach 10 minütiger Inkubation werden die Proben am FACS gemessen und ausgewertet.

### 3.2.6 Auswahl der Patienten und Follow-up Daten

Ausgewählt wurden Patienten aus dem Patientenpool der Charité in den Jahren 1996 bis 2002. Einschlusskriterien waren die Erstdiagnose „fernmetastasiertes kolorektales Karzinom“ (TxNxM1 bzw. UICC IV) und die Ersttherapie „Chemotherapie mit 5-FU/LV als alleinigem Chemotherapeutikum“ nach tumorresizierender Operation. Ausschlußkriterien waren andere stark lebensverkürzende Krankheiten (wie z.B. ein weit fortgeschrittenes Zweitmalignom) und Abbruch der ersten Chemotherapie aus anderen Gründen als Progress der Erkrankung (z.B. Angina pectoris als unerwünschte Nebenwirkung der Chemotherapie, Tod durch postoperative Komplikationen). Weitere Ausschlußkriterien waren eine neoadjuvante Chemotherapie, bekannte oder vermutete hereditäre Karzinomsyndrome (FAP, HNPCC-Syndrom), bekannte chronisch entzündliche Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa). Durch Evaluation der stationären und der Poliklinik-Akten sowie Kontaktierung der behandelnden Hausärzte oder

onkologischen Fachärzte wurden retrospektiv die benötigten Daten ermittelt und anonymisiert verwendet.

### 3.2.7 K-*ras* Onkogen Mutationsassay

Der K-*ras* Mutationsassay wurde von Dido Lenze durchgeführt. Kurz zusammengefasst, wurde zum Nachweis von K-*ras* Mutationen DNS aus Stellen der Paraffingewebeproben extrahiert, die reich an Tumorzellen waren. Die Extraktion erfolgte mittels QIAamp DNS mini Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Menge und Reinheit der extrahierten DNS wurde photometrisch gemessen. Die Amplifikation des Exon 1 des K-*ras* Gens wurde wie von Brink beschrieben durchgeführt<sup>138</sup>. Das daraus gewonnene 179 Basenpaare umfassende Amplifikationsprodukt wurde mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit sequenziert und Mutationen auf Kodon 12 oder 13 konnten durch Vergleich mit der Keimzellsequenz identifiziert werden.

### 3.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Programme StatView Version 4.51 und SPSS Version 17.0.<sup>A</sup> Die Patientenverlaufsdaten wurden mit der Methode nach Kaplan-Meier und dem log-rank Mantel-Cox Test ausgewertet. Zur Berechnung wurden die Monate von der Erstdiagnose bis zum Fortschreiten der Krankheit (Progressive Disease) herangezogen. Die Seneszenz-Signatur für Paraffingewebe wurde wie im Ergebnisteil beschrieben mit Hilfe von Mittelwerten der Testadenome erstellt. Mangels ausreichender Fallzahlen konnte keine Regressions- oder Diskriminanzanalyse zur Herstellung des Seneszenzindex verwendet werden. Für den Vergleich von Mittelwerten und die Prüfung auf Gruppengleichheit wurden verschiedene statistische Verfahren angewandt und bei den jeweiligen Ergebnissen mitangegeben (Mann-Whitney-U-Test, exakter Test nach Fisher, Chi-Quadrat nach Pearson). Als Signifikanzniveau wurde bei allen Berechnungen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (p-Wert <0,05) festgelegt. Die Ergebnisse werden der Übersichtlichkeit wegen auf eine Stelle nach dem Komma gerundet angegeben, p-Werte werden auf 2 Stellen nach dem Komma gerundet angegeben.

---

<sup>A</sup> Die Aufstellung der Seneszenz-Signatur erfolgte in Zusammenarbeit mit Christoph Standfuß.