

Aus dem
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin (CC5)
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Signalleitung, Zellhierarchien und epigenetische Prozesse im transformierten Darmepithel

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach medizinische Molekularbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Markus Morkel
geboren am 22. März 1969 in Hanau

Eingereicht: November 2013

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel-Döberitz

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Sültmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
I. Einleitung	
1. Genetische und epigenetische Prozesse während der Tumorinitiation und -progression	4
1a. Die Bedeutung des somatischen Genoms	4
1b. Die Bedeutung von tumorspezifischen Mutationen	5
1c. Die Bedeutung der epigenetischen Kontrolle	7
2. Intestinale Karzinogenese: Ein Modellsystem der Tumorentwicklung	8
3. Genetische Mausmodelle für intestinale Tumorinitiation und -progression.	13
II. Eigene Arbeiten	
1. Untersuchungen zu Genexpressionsmustern und Signalkaskaden in fortgeschrittenen Kolonkarzinomen	15
2. Etablierung von neuartigen Mausmodellen zur Untersuchung der Onkogenwirkung im Darmepithel	61
3. Epigenetische Analyse von Darmkrebs in Maus und Mensch	84
III. Diskussion	
1. Onkogenwirkungen im Darmepithel	101
2. Identifizierung einer prognostischen Signatur für fortgeschrittene Kolonkarzinome	103
3. Epigenetische Signaturen als diagnostische Biomarker	105
IV. Zusammenfassung	107
V. Referenzen	109
VI. Erklärung nach §4 Absatz 3(k) der Habilitationsordnung	115

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>adenomatous polyposis coli (gene)</i> . (Gen für) erblichen Darmkrebs
BAMBI	<i>BMP- and Acitivin membrane-bound inhibitor</i> (Gen)
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> (Genfamilie/Signalweg)
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i> . Methylierungsphänotyp bei Darmkrebs
CpG	C - G Dinukleotid
DMR	differenziell methylierte Region
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , eine Rezeptor-Tyrosinkinase
EMT	epithelial-zu-mesenchymale Transition
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i> . Erblicher Darmkrebs mit APC-Mutation
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Genfamilie/Signalweg)
GTP	Guanosin-Triphosphat
H3K27me3	Trimethylierung am Lysin 27 des Histon 3 (epigenetischer Marker)
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LT (SV40)	<i>long terminal repeat</i> (des Simian Virus 40)
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase (Signalweg)
MeDIP-Seq	Sequenzierung immunpräzipitierter methylierter DNA (Methode)
mES	murine embryonale Stammzelle
MIN	<i>multiple intestinal neoplasia</i> (APC-mutante Maus)
MSI	mikrosatelliten-instabil
MSS	mikrosatelliten-stabil
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (Signalweg)
PRC2	Polycomb Repressor Komplex 2 (epigenetischer Regulator)
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (Methode zur Bestimmung der Genaktivität)
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> (Genfamilie)
RAS	<i>rat sarcoma</i> (Genfamilie)
rtTA	tetrazyklin-abhängiger reverser transkriptioneller Aktivator
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> (Signalweg)
TP53	<i>tumor suppressor phosphoprotein 53</i> (Gen. In der Maus TRP53)
Wnt	<i>wingless integration site</i> (Genfamilie/Signalweg)

Offizielle Gen- und Proteinsymbole sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht durchgängig im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

I. Einleitung

1. Genetische und epigenetische Prozesse während der Tumorinitiation und -progression

Über 15% aller Menschen sterben weltweit an Krebs¹. Die Entstehung und der Verlauf von Krebserkrankungen sind dabei eng mit Eigenschaften des somatischen Genoms und den tumorspezifischen Mutationen des Patienten verknüpft. Daher kann jede Krebserkrankung mit einigem Recht als individuelle Erkrankung angesehen werden, die daher einer maßgeschneiderten Behandlung bedarf.

Die medizinische Molekularbiologie kann mit Hilfe von verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen, transgenen Techniken, sowie mit modernen Hochdurchsatztechnologien entscheidend zur Aufklärung von Krankheitsmechanismen in der Tumorentstehung und -progression beitragen. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Weiterentwicklung der Tumordiagnostik und die Entwicklung neuer Therapien. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zwischen verschiedenen Ebenen zu unterscheiden, auf denen das Erbgut Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung des Tumors nimmt: Erstens besitzt jeder Mensch ein einzigartiges Genom, das aus einer bestimmten Kombination von Genvarianten besteht. Diese kodieren für ein individuelles Repertoire an Proteinen, die zelluläre Eigenschaften bestimmen und so Tumorzinzidenz und -verhalten modulieren. Zweitens entwickeln sich im Laufe der Tumorzprogression unterschiedliche und individuelle Muster von tumorspezifischen Mutationen, die wichtige zelluläre Signalüberträger verändern und so zentrale Eigenschaften der Krebszelle bestimmen. Drittens regulieren tumorspezifische epigenetische Prozesse die Mitwirkung einzelner Allele und Gene am Transformationsprozess.

1a. Die Bedeutung des somatischen Genoms

Die individuelle Mischung von paternal und maternal ererbten Allelen hat nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung eines Menschen, sondern auch auf die Wahrscheinlichkeit, an bestimmten Tumoren zu erkranken. So ist die Vererbung mutierter Allele von Tumorsuppressoren eine Hauptursache familiärer Tumorsyndrome: Beispielsweise führt eine defekte Kopie des Tumorsuppressors *RB1* im Träger zu beidseitigen und multiplen Retinoblastomen², während eine defekte Kopie von *APC* ursächlich mit familiärer intestinaler Polyposis verknüpft ist³. In diesen

Tumorsyndromen wird stets ein defektes Allel eines Tumorsuppressors von den Eltern geerbt. Die zweite intakte Kopie des Gens mutiert anschließend mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in einigen Körperzellen, die dadurch zu tumor-initiiierenden Zellen werden. Die Erbgänge vieler sporadischer (d.h. nicht-familiärer) Tumoren sind weniger eindeutig, aber dennoch vom Patientengenom abhängig. Zahlreiche Gene beeinflussen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Tumorerkrankung, beispielsweise, indem sie Einfluss auf die Effektivität des DNA-Reparatursystems, und damit auf die Mutationsrate des Genoms, nehmen. So bestimmen Varianten der Gene *BRCA1* und *BRCA2* die Anfälligkeit für Brustkrebs und andere Tumorarten⁴. *BRCA1* und *BRCA2* sind daher auch Angriffspunkt gezielter molekularer Therapien⁵. Sogenannte "*Modifier*"-Gene sind häufig keine klassischen Tumorsuppressoren (bei denen ein Allel in der Keimbahn mutiert wurde und ein anderes somatisch verlorengeht), sondern natürlich vorkommenden allele Genvarianten, die im Laufe der Evolution selektiert wurden, jedoch als unerwünschten Nebeneffekt die Tumorzinzidenz ihrer Träger positiv modulieren. Tumor-*Modifier*-Gene sind ein zentrales Objekt der wissenschaftlichen Grundlagenforschung^{6,7}, aber erschweren durch die resultierende Heterogenität der Patientengenome auch die Entschlüsselung der Wirkung von Schlüsselmutationen der Krebszellen. Daher sind isogene Zellkultur- und Tiermodelle ein wichtiges Hilfsmittel, um Wirkungen von Mutationen isoliert zu betrachten.

1b. Die Bedeutung von tumorspezifischen Mutationen

Der Verlauf einer Krebserkrankung und der Erfolg einer zielgerichteten Therapie wird wesentlich von Mutationen bestimmt, die das Genom der Tumorzellen vom Erbgut der normalen Körperzellen unterscheiden. Das Auftreten von Schlüsselmutationen verleiht Krebszellen bestimmte Eigenschaften, die sich auf das Überleben und die Proliferation vorteilhaft auswirken, und somit zur klonalen Expansion der mutierten Zellen führen. So wird eine anfänglich gutartige Tumorerkrankung schrittweise durch die Anhäufung von Mutationen zu einer Wucherung, die alle Hauptmerkmale von Krebs (engl. *hallmarks of cancer*) zeigt, nämlich ungezügelter Zellteilung, Resistenz gegen wachstumshemmende Faktoren, Hemmung der Zelldifferenzierung und des programmierten Zelltodes (Apoptose), unendliches Zellteilungspotential, und die Fähigkeit, den Gewebeverband zu verlassen⁸. Zudem tragen ein veränderter Zellstoffwechsel und lokale Entzündungsreaktionen zum Krebsgeschehen bei⁹.

Eine wichtige Klasse von Mutationen, Amplifikationen oder Translokationen führt zur Konversion zellulärer Proto-onkogene zu Onkogenen^{10,11}. Im Gegensatz zu den im Zellkontext fein regulierten Proto-onkogenen unterliegen mutierte Onkogene keinen ausreichenden Beschränkungen ihrer Aktivität. Solche aktivierenden Mutationen treten häufig in Signaltransduktionsmolekülen, wie z.B. membranständigen Rezeptoren, zytoplasmatischen Signalmolekülen oder Transkriptionsfaktoren auf, und aktivieren so zelluläre Signalwege, verschieben Aktivitätsgleichgewichte zwischen benachbarten Signalwegen, und inaktivieren Rückkopplungsmechanismen der Signalleitung¹². Wichtige Beispiele sind aktivierende Mutationen in Proto-Onkogenen des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges, beispielsweise im EGFR-Transmembranrezeptor, in der RAS-Familie von kleinen GTP-abhängigen Signaltransduktionsmolekülen (NRAS, KRAS, HRAS)^{13,14}, und der RAF-Kinase-Familie (insbesondere in BRAF). Zahlreiche weitere Signalwege können ebenfalls durch Onkogene aktiviert werden, z.B. die PI3K- und Wnt/ β -Catenin-Kaskaden¹². Eine andere Klasse von Mutationen führt zur Inaktivierung von Genen, die im funktionstüchtigen Zustand die Zellteilung oder andere tumor-relevante Eigenschaften limitieren. Wichtige Vertreter dieser sogenannten Tumorsuppressorgene sind *TP53* (auch p53, oder –in der Maus– *TRP53* genannt), das Retinoblastom-Protein *RB1*, sowie *APC*, das die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges kontrolliert^{3,15-17}.

Häufig auftretende Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressoren führen also zur Deregulation wichtiger Steuerelemente in der Krebszelle. Die essentielle Bedeutung dieser Schlüsselmutationen wird auch darin offenbar, dass eine geringe Anzahl von zielgerichteten genetischen Änderungen ausreichend ist, um eine normale Zelle zur Krebszelle umzuprogrammieren. Versuche in menschlichen Brustepithelzellen haben gezeigt, dass die Aktivierung der Gene *TERT* (kodierend für Telomerase) und einer onkogenen Variante von *RAS* (kodierend für *HRAS*^{V12G}), sowie die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *TP53* und *RB1* durch das LT Genprodukt des SV40-Virus ausreichen, um sie zu Krebszellen zu transformieren, die in Nacktmäusen wachsen^{18,19}. Auch in diesen Versuchen zeigte sich wiederum die Wechselwirkung zwischen Genom und Onkogenen: In Zellen von genetisch definierten Nagern (Mäusen oder Ratten) waren lediglich zwei Mutationen für die Konversion zur Krebszelle notwendig²⁰⁻²².

Bestimmte Schlüsselmutationen treten innerhalb einer Tumorentität häufig auf, und sind daher potenzielle therapeutische Angriffspunkte. Mutationen in Kinasen oder Oberflächenrezeptoren haben sich hier als wichtige Zielstrukturen erwiesen, da sie von kleinmolekularen Inhibitoren oder therapeutischen Antikörpern spezifisch gebunden und in ihrer Aktivität gehemmt werden können. So existieren heute bereits zahlreiche Therapien, die zielgerichtet mit der erhöhten Aktivität mutierter Signalüberträger oder betroffener Signalwege interferieren. Von besonderer medizinischer Bedeutung ist die Therapie von metastasierendem Brustkrebs durch Trastuzumab, einem Antikörper gegen die Rezeptor-Tyrosinkinase HER2, die Therapie von chronischer myeloischer Leukämie und gastrointestinalen stromalen Tumoren durch den Multikinaseinhibitor Imatinib, die Behandlung von Melanompatienten mit PLX4032, einem Inhibitor von mutiertem aktiviertem BRAF, sowie die Behandlung von Lungen-Adenokarzinompatienten mit Crizotinib (gerichtet gegen die EML4-ALK-Fusionskinase) oder Gefitinib (einem EGFR-Inhibitor)²³⁻²⁷. Solche zielgerichteten Therapien führen jedoch häufig zu sekundären Resistenzen, d.h. zu Veränderungen des Tumors durch die Selektion von Tumorzellen, die durch weitere Mutationen oder Amplifikation von Onkogenen resistent gegen den Wirkstoff geworden sind²⁸⁻³⁰. Diese begrenzte Wirkung zielgerichteter Therapien zeigt, dass weitere (eventuell parallele) Angriffspunkte für Therapien gefunden werden müssen. Die in vielen Patienten stereotyp ablaufenden Muster der Resistenzbildung geben allerdings Anlass zur Hoffnung, dass die Anzahl der möglichen resistenzauslösenden Mutationen begrenzt ist³¹. Dieser Befund ist für die Krebsforschung von höchster Bedeutung, da die vermutlich geringe Anzahl der relevanten Angriffspunkte somit der theoretischen (z.B. mathematische Modellierung der zellulären Prozesse) und experimentellen Forschung zugänglich ist.

1c. Die Bedeutung der epigenetischen Kontrolle

Eine dritte Ebene, auf der das Genom das Fortschreiten einer Krebserkrankung beeinflusst, betrifft die epigenetischen Prozesse. Darunter versteht man Regulationsmechanismen, die – unabhängig von Änderungen der Basenabfolge – die Zugänglichkeit der DNA und damit die Aktivität der betroffenen Gene beeinflussen. Letztlich wird so also der Phänotyp durch das Zusammenwirken des Genoms mit den Genprodukten gesteuert^{32, 33}. Auf molekularer Ebene wird die epigenetische Kontrolle durch Methylierung der DNA (vorwiegend an Cytosinen von CpG-Dinukleotiden), sowie

durch mannigfaltige Modifikationen an den freiliegenden Enden von Histonen, die Verpackungsproteine der DNA-Doppelhelix darstellen, vermittelt. Dabei interagieren beide Ebenen der epigenetischen Regulation (also DNA- und die Histon-Ebene) miteinander, um gemeinsam die zeitweilige oder dauerhafte Aktivierung oder Stilllegung von bestimmten Abschnitten des Genoms zu erreichen^{34,35}. Diese Mechanismen sind essentiell für die normale Genregulation während der Entwicklung und im erwachsenen Organismus. In letzterem steuern sie Gewebekomöostase, Reparaturprogramme nach Verletzungen oder Infektionen, sowie die Anpassung des Organismus an Umweltbedingungen. Schon früh wurde erkannt, dass epigenetische Prozesse in Tumorzellen anders als im Normalgewebe ablaufen^{36,37}. Ein erster Befund legte nahe, dass die DNA von Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe hypomethyliert vorliegt^{38,39}. Als weiterer wichtiger Mechanismus der epigenetischen Kontrolle in Tumoren wurde die Hypermethylierung einzelner regulatorischer Abschnitte erkannt, die zur Inaktivierung von Genen führen kann^{40,41}. Eine epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und microRNAs kann so zur Tumorprogression beitragen⁴²⁻⁴⁴. Somit stellt (epigenetische) CpG-Hypermethylierung ein funktionelles Äquivalent der (genetischen) Inaktivierung einzelner Gene durch Mutationen dar. Neben der DNA-Methylierung sind in Tumorzellen auch die Mechanismen gestört, die Genregulation über Histon-Modifikation steuern. Die grundlagenorientierte Krebsforschung beschäftigt sich mit der Möglichkeit, epigenetische Markierungen als Tumormarker zu verwenden, um so aus dem Blut des Patienten Informationen über das Vorhandensein eines Tumors (diagnostische Biomarker zur Früherkennung), oder zur Wirksamkeit bestimmter Medikamente (prädiktive Marker) zu lesen.

2. Intestinale Karzinogenese: Ein Modellsystem der Tumorentwicklung

Darntumore gehören zu den häufigsten soliden Tumoren. Klinische, histopathologische und molekulare Untersuchungen deuten darauf hin, dass Kolon-Adenomkarzinome durch sequenzielle Anhäufung von Mutationen in bestimmten Schlüsselgenen entstehen. Durch diese Mutationsprozesse entwickeln sich gutartige intestinale Adenome schrittweise zu invasiven und metastasierenden Karzinomen^{3,45}. Dieser Prozess ist langwierig und benötigt im Menschen mehrere Jahre. Die lange Latenzzeit zwischen der

Entstehung des Adenoms und der Progression zum Karzinom korreliert dabei mit der fortschreitenden Deregulation zellulärer Kontrollmechanismen⁴⁶. Nach diesem Modell entstehen intestinale Adenome aus einem monoklonalen Ursprung, nämlich aus einer Zelle, die einen Wachstums- oder Überlebensvorteil gegenüber den benachbarten Zellen im intestinalen Epithel hat. Mutationsanalysen in frühen Adenomen zeigten, dass die tumor-initiiierende Zelle meistens inaktivierende Mutationen in beiden Allelen des Tumorsuppressorgens *APC* trägt. Aufgrund der hohen Prävalenz der *APC*-Mutation in frühen Adenomen wird dieses Gen auch als Torwächter (engl. *gatekeeper*) der intestinalen Karzinogenese verstanden^{3,46}. In der Folgezeit wurde eine Schlüsselrolle von *APC* für die Kontrolle der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade offenbar^{47,48}. Dieser Signalweg wurde zudem als Hauptregulator von Stammzeleigenschaften und Proliferation im Darmepithel und in Darmtumoren erkannt⁴⁹⁻⁵². Inzwischen ist klar, dass die Inaktivierung von *APC* zwar das häufigste molekulare Ereignis bei der Entstehung von Kolonadenomen ist, aber andere Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg funktionell weitgehend äquivalent sind: So finden sich in intestinalen Adenomen und Karzinomen, alternativ zur *APC*-Mutation, auch aktivierende Mutation in *CTNNB1* (kodierend für β -Catenin), inaktivierende Mutation in *AXIN2* (kodiert für einen *feedback*-Inhibitor des β -Catenin-Signals), oder aktivierende Fusionen innerhalb der R-Spondin-Genfamilie (die für Wnt Ko-liganden kodiert)^{53,54}. Zusammengefasst scheinen aktivierende Mutationen innerhalb des Wnt/ β -Catenin Signalweges also Auslöser der konventionellen Adenom-Karzinom-Sequenz im Darmepithel zu sein.

Der Übergang vom Adenom zum Karzinom verläuft durch die Akkumulation weiterer Mutationen³. Dabei gilt eine Anzahl von vier bis fünf funktionell wichtigen Mutationen als Schwellenwert für die Etablierung eines Karzinoms. Anstelle der relativ einheitlichen Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Kaskade zum Zeitpunkt der Tumorinitiation treten im weiteren Verlauf nun individuelle Variationen von Mutationsmustern auf, die die Tumorprogression beschleunigen. Dennoch lassen sich häufig auftretende Schlüsselmutationen bestimmen. Auch diese Mutationen können wiederum zu Gruppen äquivalenter Mutationen innerhalb eines Signalweges zusammengefasst werden. Zu den häufig auftretenden Mutationen gehören solche im Tumorsuppressorgen *TP53*, in den MAPK-Signalmolekülen *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* und *NF1*, inaktivierende Mutationen in *SMAD4* und *TGFRB2*, die den TGF- β -Signalweg kontrollieren, Mutationen in den PI3K-Signalüberträgern *PTEN* und *PIK3CA*, in der Ubiquitin-Ligase *FBXW7* und den

Transkriptionsmodulatoren *ARID1A* und *CREBBP* und vielen mehr (siehe z.B. in der Datenbank *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)* unter <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

Neben zielgerichteten Studien, die Mutationen in wenigen Genen untersucht haben, sind in den letzten Jahren vermehrt genomweite Sequenzierungsstudien durchgeführt worden, in denen das somatische Genom des Patienten mit seinem Tumorgenom verglichen wurde. Diese Studien zeichneten erstmals ein detailreiches Bild von der Komplexität der Aberrationen im Tumorgenom⁵⁵⁻⁵⁷. Neben häufig wiederkehrenden Mutationen, die aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens wahrscheinlich einen Selektionsvorteil für den mutationstragenden Tumorzellklon darstellen und somit als funktionell wichtig charakterisiert werden, fanden sich tausende sporadische Mutationen, die zwischen Patienten nicht konserviert sind. Letztere sind vermutlich Ausdruck der höheren Mutationsfrequenz im Tumorgenom, tragen aber funktionell nur wenig zum Tumorgeschehen bei. Für die beiden Klassen von wiederkehrenden (somit funktionell wichtigen) und ziellos im Genom verteilten Mutationen wurden die Begriffe *driver*- und *passenger*-Mutationen geprägt: die einen, *driver*, steuern das Tumorwachstum, die anderen, *passengers*, werden lediglich mit auf den Weg von einer Zellgeneration zur anderen genommen⁵⁷.

Diese hohe Anzahl von Mutationen im Tumorgewebe ist mit dem Vorhandensein einer wichtigen Gruppe von tumorspezifischen Mutationen zu erklären, die zu genomischer Instabilität führen. Mutationen in *TP53* spielen hier wahrscheinlich eine doppelte Rolle in der Kontrolle der Genom-Integrität und als Signalmolekül⁵⁸, und wurden bereits oben erwähnt. Zudem spielen Mutationen im Zyklin-kinase-Inhibitorlokus *CDKN2A* (kodiert für p16-INK4A) und den *mismatch repair* Genen *MSH1*, *MSH2*, *MSH6* oder *PMS2* eine wichtige Rolle in der Kontrolle der genomischen Stabilität. Der Dualismus zwischen Signalweg-deregulierenden Mutationen und solchen Mutationen, die das DNA-Reparatursystem betreffen, findet sich anschaulich auch in familiären Tumorsyndromen des Darms wieder: In FAP(=familiäre adenomatöse Polyposis)-Patienten wird eine heterozygote Mutation im *gatekeeper APC* vererbt, in Lynch-Syndrom-Patienten eine Mutation in Genen des DNA-Reparatursystems. In beiden Fällen ist die Darmkrebsrate stark erhöht⁴⁶.

Die Progression von intestinalen Adenomkarzinomen zeichnet sich neben den genetischen Mutationsereignissen auch durch fortschreitende Deregulierung der epigenetischen Kontrolle des Genoms aus. Ein erster Befund legte nahe, dass Darmtumorzellen generell eine geringere Methylierungsfrequenz von CpG-Dinukleotiden im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen³⁸. Insbesondere waren repetitive Sequenzen, die im Normalzustand hochgradig methyliert sind, in Tumoren weniger stark modifiziert. Zudem stellte sich heraus, dass Promoterregionen zahlreicher Tumorsuppressorgen-Kandidaten in Gewebeproben und in entsprechenden Zelllinien hypermethyliert und dadurch inaktiviert vorliegen. Dieser Mechanismus betrifft in Kolonkarzinomen und Zelllinien beispielsweise die Gene *CDKN2A*, *DKK1*, *HIC1* und andere^{59,60}. Obwohl verschiedene Hypermethylierungsereignisse bereits in Adenomen gefunden wurden, kann eine direkte Korrelation von genetischen Mutationen zu epigenetischer Deregulation auf Basis dieser Daten kaum vorgenommen werden: Menschliche Adenome sind zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung meist schon mehrere Jahre alt und tragen zahlreiche Mutationen, darunter wahrscheinlich einige *driver*-Mutationen.

Die oben skizzierten Ereignisse sind charakteristisch für die Entstehung von tubulären oder villösen intestinalen Adenomen und ihrer Progression zu Adenokarzinomen. Diese Dickdarntumoren stellen ein Großteil der klinischen Fälle dar. Daneben gibt es weitere Tumorstufen, die ebenfalls zu Karzinomen fortschreiten können. Serratierte (oder gezahnte) Adenome weisen häufig schon früh starke Veränderungen des Epigenoms auf (engl. *CpG island methylator phenotype* = CIMP)^{61,62}. In Abweichung zur von Vogelstein postulierten Adenom-Adenokarzinom-Sequenz sind in diesen Tumoren *BRAF*-Mutationsfrequenzen zu einem frühen Zeitpunkt bereits hoch, so dass eine initiiierende Rolle von *BRAF* im serratierten Progressionsweg diskutiert wird⁶³. Hämatoide stellen eine weitere Form früher Darmtumore dar, die sich in ihren Mutationsmustern von klassischen Adenomen unterscheiden⁶⁴.

Die frühe Erkennung und die adäquate Einteilung nach histopathologischen Kriterien (TNM-System)⁶⁵ spielt beim Kolonkarzinom eine wichtige Rolle, insbesondere da frühe, aber nicht späte Stadien durch vollständige chirurgische Entfernung heilbar sind. Die vergleichsweise langsame Progression vom Adenom zum Kolonkarzinomen eröffnet ein langes Zeitfenster für die Tumorfrüherkennung, die klassischerweise per Koloskopie

durchgeführt wird. Da dieses Verfahren jedoch von einem Großteil der Bevölkerung nicht in Anspruch genommen wird, bleibt die Suche nach molekularen Biomarkern, die aus dem Blut bestimmt werden können, ein wichtiges Ziel der Forschung. Hier wurden bereits epigenetische Marker identifiziert, die eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, insbesondere die Methylierung des *SEPT9*-Gens⁶⁶⁻⁶⁹. Die Identifizierung weiterer Marker könnte zur Verbesserung der Möglichkeiten der molekularen Früherkennung beitragen und wurde in den hier dargestellten Arbeiten daher im Modellorganismus Maus untersucht.

Neben der klassischen histopathologischen Einteilung in verschiedene Stufen mit unterschiedlich ausgeprägter lokaler Progression und unterschiedlich fortgeschrittener Metastasierung in Lymphknoten und fernen Organen kann eine zusätzliche molekularpathologische Einordnung nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Zum einen werden verschiedene Mutationen mit therapeutischer Relevanz bestimmt, so beispielsweise aktivierende Mutationen im MAPK-Signalweg (insbesondere in *KRAS*, *BRAF*), die das therapeutische Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab bestimmen. Zum anderen können Tumoren nach ihrer chromosomalen (In-)stabilität (CIN positiv *versus* negativ), nach ihrer Mikrosatellitenstabilität (MSS *versus* MSI) oder ihres epigenetischen Musters (CIMP, siehe oben) eingeteilt werden⁷⁰.

Die in der vorliegenden Habilitation aufgeführten eigenen Arbeiten untersuchen die Mechanismen der Tumorentstehung und -progression auf mehreren Ebenen. Zum einen dienen Tumorproben und -zelllinien als Ausgangsmaterial für die Untersuchung von tumorspezifischen Aktivitätsmustern, zum anderen werden reduktionistische Ansätze benutzt, um einzelne tumorrelevante Charakteristika isoliert zu betrachten. Dies wird besonders in den hergestellten und benutzten Mausmodellen deutlich: Transgene Mausmodelle erlauben Effekte einzelner onkogener Mutationen in Abwesenheit anderer genetischer Unterschiede zu untersuchen (siehe Farrall et al., 2012), und das APC^{Min}-Modell der Darmkrebsinitiation erlaubt, epigenetische Veränderungen in der Abwesenheit von individuellen genetischen Unterschieden und weiteren Mutationen zu erfassen (siehe Grimm et al., 2013). Es lohnt daher, näher auf die Maus als Modellorganismus in der (Darm-)Krebsforschung einzugehen.

3. Genetische Mausmodelle für intestinale Tumorentstehung und -progression.

Histopathologische und molekulare Analysen von menschlichen Tumorproben und Zelllinien erlauben häufig eine Korrelation zwischen klinischen und molekularen Befunden. Zudem können Zelllinien durch molekularbiologische Techniken manipuliert werden, und so funktionelle Befunde zu einzelnen Mutationen erhoben werden. Solche Versuche lassen jedoch oft nur indirekte Schlüsse auf den Beitrag der untersuchten Mutation, bzw. des untersuchten Gens im Tumorgeschehen zu, da die Zellen isoliert außerhalb ihrer normalen Umgebung untersucht werden. Tiermodelle haben deshalb in der Vergangenheit einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung von Tumorerignissen geleistet⁶. Die Maus ist hier ein wichtiges Versuchstier, da sie als Säugetier dem Menschen physiologisch sehr nahe steht, und ihr Genom durch einfache Techniken in Stammzellen manipuliert werden kann. Zudem stehen für die Maus standardisierte Versuchstierstämme zur Verfügung (beispielsweise C57Bl/6, dessen Genom komplett sequenziert ist und in vielen Organen vergleichsweise ausgeprägte Tumorphänotypen zeigt⁷¹).

In den letzten Jahrzehnten konnten Mausmodelle mehrere wichtige Erkenntnisse zum intestinalen Tumorgeschehen liefern⁷². APC^{Min} oder (vereinfacht) Min(*multiple intestinal neoplasia*)-Mäuse entstammen einer Mutagenese-Studie und tragen eine Mutation im *Apc*-Gen^{73,74}. Sie dienen daher als Modell für das menschliche FAP-Syndrom als auch für den Hauptweg der sporadischen Tumorentstehung in der Adenom-Karzinom-Sequenz. Mäuse, die Mutationen im *mismatch repair*-Gen *Msh2* tragen, dienen als Modell für das Lynch Syndrom⁷⁵. Mutationen im BMP-Signalweg führen in der Maus zu intestinalen Hämangiomen⁷⁶. Auch hier konnten Mausmodelle Hinweise auf die Krankheitsmechanismen beim Menschen geben. Die Entstehung intestinaler Tumore kann in der Maus auch chemisch induziert werden, beispielsweise durch die krebserregende Chemikalie Azoxymethan – die entstehenden Kolonadenome tragen bevorzugt Mutationen in *Ctnnb1* (kodierend für β -Catenin)^{77,78}, analog zu einer Subgruppe von Darmtumoren beim Menschen. Vergleiche der Genexpressionsprofile von intestinalen Adenomen der Maus und des Menschen lassen vermuten, dass die grundlegenden Signalmechanismen zwischen den Spezies konserviert sind⁷⁹.

Mausmodelle, die Mutationen in weiteren onkogenen Signalwegen tragen, wie beispielsweise in den MAPK oder PI3K-Signalkaskaden^{80,81}, sowie Modelle die

Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg mit weiteren *driver*-Mutationen kombinieren, beispielsweise in *Smad4*⁸², *Kras*⁸³ oder in Komponenten des NF- κ B-Signalweges⁸⁴, zeigen ebenfalls Tumorphänotypen, die es erlauben, bestimmte Aspekte der Initiation oder Tumorprogression von adenomatösen Darmtumoren im Menschen zu entschlüsseln. Zudem konnte kürzlich ein *Braf-knock-in*-Mausmodell wichtige Erkenntnisse zur Initiation und Progression von serratierten Darmtumoren liefern und eine initiiertende Rolle der aktivierenden BRAF-Mutation in diesem Progressionsweg bestätigen⁸⁵.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch *knock-out*-, *knock-in*- und transgene Mausmodelle funktionelle Rollen von häufig mutierten Onkogenen während der Progression molekular definiert und im Kontext des Organismus untersucht werden können. Transgene Mäuse, sowie Zellkulturen aus solchen Tieren stellen daher ein wichtiges Werkzeug dar, um Signalprozesse innerhalb von Tumorzellen, Wechselwirkungen zwischen Krebszellen und benachbarten Geweben, sowie die Auswirkungen des Krebsgeschwürs auf den Gesamtorganismus zu studieren. Zudem ermöglicht die Verwendung isogener, vollständig sequenzierter Mausstämme die Anwendung moderner genomischer Technologien und sichert eine hohe Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen.

II. Eigene Arbeiten

1. Untersuchungen zu Genexpressionsmustern und Signalkaskaden in fortgeschrittenen Kolonkarzinomen

Fritzmann J*, **Morkel M***, Besser D*, Budczies J, Kosel F, Brembeck FH, Stein U, Fichtner I, Schlag PM, Birchmeier W. A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential. **Gastroenterology** 2009 Jul;137:165-75. (*gemeinsame Erstautoren).

[http:// dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.041](http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.041)

Jürchott K, Kuban R-J, Krech T, Blüthgen N, Stein U, Walther W, Friese C, Kielbasa SM, Ungethüm U, Lund P, Knösel T, Kemmner W, **Morkel M**, Fritzmann J, Schlag PM, Birchmeier W, Krueger T, Sperling S, Sers C, Royer HD, Herzel H, Schäfer R. Identification of Y-box binding protein 1 as a core regulator of MEK/ERK pathway dependent gene signatures in colorectal cancer cells. **PLoS Genetics**. 2010 Dec 2

[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001231](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001231)

Leushacke M, Spörle R, Brouwer-Lehmitz A, Fritzmann J, Theis M, Buchholz F, Herrmann BG, **Morkel M**. An RNA interference phenotypic screen identifies a role for FGF signals in colon cancer progression. **PLoS ONE**, 2011 Aug 11

[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023381](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023381)

Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressoren schlagen sich unter anderem in charakteristischen Genexpressionsmustern in Krebszellen nieder. Diese Modulationen der Genexpression führen ihrerseits zu Veränderungen der zellulären Signaltransduktion und des Zellphänotyps. Moderne Techniken zur genomweiten Erfassung der Genaktivität, wie beispielsweise durch Mikroarrayanalysen oder massiv-paralleles Sequenzieren können daher benutzt werden, um Genexpressionsmuster mit Tumorphänotypen zu korrelieren. Ein wichtiges Ziel solcher Studien ist die Etablierung von Genexpressions-Signaturen zur Unterscheidung zwischen bestimmten Tumortypen

86-88.

Zur Analyse von Genexpressionsunterschieden zwischen lokal fortgeschrittenen, aber nicht-metastasierenden kolorektalen Karzinomen und metastasierenden kolorektalen Karzinomen wurden in der Arbeit Fritzmann et al. (2009) 95 Genexpressionsprofile erstellt und verglichen. Diese umfassten 20 Profile von nicht-metastasierenden Karzinomen der Stufen T3 und T4, 21 Profile von metastasierenden Karzinomen, die lokal ähnlich weit fortgeschritten waren, sowie 50 Expressionsprofile von Lymphknoten-, Leber- und Lungenmetastasen, sowie 4 Profile aus dem normalen Dickdarm. Als Ausgangsmaterial diente für alle Profile RNA aus mikrodiseziertem Epithel aus gefrorenen Gewebeproben. Genexpressionsprofile wurden mittels Affymetrix-Mikroarrays gewonnen.

Ein Vergleich der Genexpressionsprofile durch hierarchische Clustering-Analyse zeigte, dass ein globaler Unterschied in der Genexpression nur zwischen normalem Darmepithel und den Tumoren sichtbar ist, nicht jedoch zwischen einzelnen Gruppen von Tumorprofilen, etwa zwischen nicht-metastasierenden und metastasierenden Karzinomen, oder zwischen Primärtumoren und Metastasen. Expressionsprofile von Primärtumoren und Metastasen desselben Patienten zeigten jedoch meist eine hohe Ähnlichkeit, was in diesem Zusammenhang auch eine wichtige Qualitätskontrolle darstellte. Eingehende bioinformatische Analysen konnten im nächsten Schritt dennoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen nicht-metastasierenden und metastasierenden Karzinomen aufzeigen. So wurde eine metastasierungs-relevante Signatur von 115 Genen identifiziert. Diese Signatur enthielt zahlreiche Gene, die zelluläre Signaltransduktion steuern, unter anderem das Gen *BAMBI*, welches für einen negativ-wirkenden Rezeptor/Inhibitor (*decoy receptor*) der BMP- und TGF- β -Signalwege kodiert. Die Expression von *BAMBI* war stark mit dem Auftreten von Metastasen, und damit mit dem Überleben der Patienten korreliert; dies konnte ebenfalls mittels qRT-PCR in einem zweiten unabhängigen Tumorkollektiv gezeigt werden.

Kann die Expression von *BAMBI* Aufschluss über die Interaktion von Signalwegen während metastasierungsrelevanter Signalvorgänge geben? Um diese Frage zu bearbeiten, wurden Zellkulturmodelle zur Hilfe genommen. Aufbauend auf anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Walter Birchmeier wurde zunächst untersucht, ob *BAMBI*-Expression von der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gesteuert wird. Es

konnte gezeigt werden, dass *BAMBI*-Expression in SW480-Kolontumorzellen von β -Catenin und vom β -Catenin-Koaktivator BCL9-2 abhängig ist. Eine hohe Aktivität dieses Schlüsselsignalweges in der kolorektalen Tumorentstehung und -progression führt also zu einer Aktivierung von *BAMBI*. Was sind nun die Auswirkungen einer hohen *BAMBI*-Aktivität? Weitere Zellkulturexperimente an den Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und Caco2 führten zu der Erkenntnis, dass *BAMBI* den TGF- β Signalweg negativ beeinflusst. Dieser Signalweg wiederum unterdrückt einen mesenchymalen Phänotyp und damit einhergehende Zellmigration. Somit entfaltet *BAMBI* onkogene Aktivität durch die Verschaltung des Wnt/ β -Catenin und des TGF- β -Signalweges. Dieses Modell konnte auch durch Xenograft-Modelle an der Maus bestätigt werden. Gleichzeitig mit unserer Arbeit an *BAMBI* in der Arbeitsgruppe von Walter Birchmeier wurde *BAMBI* in der Arbeitsgruppe von Tetsu Akiyama in einer Studie an 183 Kolonkarzinomen als Biomarker für besonders aggressive Karzinome erkannt⁸⁹. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern unsere Genexpressions- und funktionellen Analysen.

Die vorgenannten Genexpressionsprofile wurden im Weiteren auch zur Analyse von MAPK-Genexpressionsmustern in Kolonkarzinomen genutzt. In der Arbeit von Jürchott et al. (2010) wurde durch Experimente an Kolonkarzinom-Zelllinien gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor YBX1 ein Schlüsselfaktor in der Signalweiterleitung von proliferativen MAPK-Signalen ist. Eine weitergehende Analyse der Expressionsprofile aus Fritzmann et al. (2009) konnte bestätigen, dass dieselben Signalmechanismen nicht nur in etablierten Zelllinien, sondern auch im Patienten aktiv sind. So konnte durch die Kombination von *in vitro* Analysen und Auswertung von Mikroarray-Profilen eine Gruppe von robusten Zielgenen des YBX1-Faktors in Kolonkarzinomen identifiziert werden.

Die retrospektive Analyse von Genexpressionsmustern in Darmtumoren ist wichtig, um Korrelationen zwischen Expressionsmustern und klinischen Parametern zu identifizieren. Diese können wichtige Hinweise für nachfolgende funktionelle Studien geben. Ein komplementärer Ansatz besteht darin, funktionelle Untersuchungen im Hochdurchsatzverfahren anzuwenden, um diese in einem zweiten Schritt mit klinischen Parametern zu vergleichen. Dieser Ansatz wurde in der Arbeit Leushacke et al. (2011) verfolgt. Ein wichtiger zellulärer Prozess während der Progression epithelialer Tumorerkrankungen ist die epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT), die eine

wesentliche Voraussetzung der Metastasierung darstellt⁹⁰⁻⁹². Während der EMT verlieren Zellen epitheliale Eigenschaften (z.B. laterale epitheliale Zelladhäsion und apikal-basale Organisation) und gewinnen mesenchymale Eigenschaften (z.B. die Fähigkeit zur Zellmigration und Gewebeinvasion). Während der Embryonalentwicklung sind EMT-Prozesse essentiell für Zellbewegungen in der Gastrulation, d.h. der Bildung der mesodermalen und endodermalen Keimblätter. Die EMT ist auch ein zentraler Prozess während der Körperachsenverlängerung des Embryos und in zahlreichen Entwicklungsprozessen während der Organentwicklung. Im erwachsenen Organismus ist EMT hingegen meist krankheitsassoziiert, beispielsweise bei der Entstehung von Fibrosen oder der Metastasierung epithelialer Tumoren. Bekannterweise sind Schlüsselmoleküle zwischen EMT-Prozessen im Embryo und im Tumor konserviert^{93,94}. Um weitere Genprodukte, die die tumorassoziierte EMT steuern, zu identifizieren, wurden in Leushacke et al. (2010) 364 Gene, deren Expressionsmuster eine Rolle in der embryonalen EMT nahelegt, einzeln in SW480 Kolonkarzinomzellen durch RNA-Interferenz ausgeschaltet. Sodann wurde der Phänotyp der behandelten Zellen evaluiert. So konnten 21 Gene identifiziert werden, deren Abschaltung zur Reversion von einem EMT-assoziierten spindelförmigen Zellphänotyp zu einem epithelialeren Phänotyp mit stärkerer Zelladhäsion führt. Einige der so identifizierten Gene haben bekannte Rollen in den Wnt/ β -Catenin-, Hedgehog- und MAPK-Signalwegen. Die Studie bestätigt so eine wichtige Rolle dieser Signalwege in Prozessen, die zur Metastasierung führen können. Im weiteren Verlauf wurde eines der identifizierten EMT-Effektorproteine, der Wachstumsfaktor FGF9, näher untersucht. Zunächst wurde mit kleinmolekularen Inhibitoren die Rolle von FGF-Rezeptorsignalen und der mit ihnen assoziierten Signalwege getestet. Phänotypische und Genexpressionsstudien ergaben, dass der den FGF-Rezeptoren nachgeschaltete MAPK-Signalweg EMT-Signale in Kolonkarzinomzellen weiterleitet und so den zellulären Phänotyp und Zellmigration steuert. Abschließend wurde die Expression von *FGF9* und dem *FGFR3*-Rezeptor in den Genexpressionsprofilen von Fritzmann et al. (2009) evaluiert und mit den Überlebensdaten der untersuchten Patienten in Beziehung gesetzt. Die starke Expression von *FGF9* und *FGFR3* war in dieser Analyse signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Diese Beziehung zwischen *FGF9*-Expression und metastasefreiem Überleben legt nahe, dass der Wachstumsfaktor FGF9 und eventuell andere Komponenten des FGF \Rightarrow FGFR \Rightarrow MAPK Signalweges eine funktionell wichtige Rolle in

der Progression kolorektaler Karzinome spielen könnten. FGF9 könnte zudem eventuell als prognostischer Faktor im Kolonkarzinom dienen. Um eine solche Rolle zu erhärten, wären weiterführende Studien mit größeren Patientenkollektiven vonnöten.

2. Etablierung von neuartigen Mausmodellen zur Untersuchung der Onkogenwirkung im Darmepithel

Vidigal JA*, **Morkel M***, Wittler L, Brouwer-Lehmitz A, Grote P, Macura K, Herrmann BG. An inducible RNA interference system for the functional dissection of mouse embryogenesis. **Nucleic Acids Res.** 2010 Mar 28. (* gemeinsame Erstautoren)

[http:// dx.doi.org/10.1093/nar/gkq199](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq199)

Farrall A, Riemer P, Leushacke M, Sreekumar A, Grimm C, Herrmann BG, **Morkel M.** Wnt and BMP signals control intestinal adenoma cell fates **Int J Cancer** 2012 Nov 15; 131 (10):2242-52.

[http:// dx.doi.org/10.1002/ijc.27500](http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27500)

Menschliche Tumoren bilden mit ihren mannigfaltigen Mutationsmustern ein komplexes Modell zellulärer Deregulation, in dem die Rolle einzelner Onko- oder Tumorsuppressorproteine nur durch großen experimentellen Aufwand studiert werden kann. Insbesondere trägt jeder humane Tumor und jede daraus abgeleitete Zelllinie ein individuelles Muster an genetischen und epigenetischen Veränderungen und deregulierten Signalen⁵⁵. Daher sind Ergebnisse, die in einer Zelllinie gewonnen wurden, oft nur eingeschränkt auf andere Zellen oder auf Patienten übertragbar. Eine weitere Beschränkung ist dadurch gegeben, dass humane Krebszelllinien meist aus späten Stadien der Tumorprogression abgeleitet sind. Eine Analyse früher Progressionsschritte ist daher meist nur indirekt möglich. Zudem repräsentieren Zelllinien einen Tumor in vielen Aspekten nur unzureichend, da die das Tumorepithel umgebenden Zelltypen nicht vorhanden sind, und die Zellen durch das Wachstum auf einer zweidimensionalen Plastikoberfläche tumorrelevante Eigenschaften verlieren⁹⁵. Mausmodelle können diese Lücke teilweise schließen, da hier die Onkogenwirkung innerhalb des Organismus studiert werden kann. Zudem erlauben Mausmodelle oft das Studium früher Tumorstadien, die in experimentellen Modellen regelhaft induziert werden können.

Wir haben in Vidigal et al. (2010) eine integrierte transgene Einheit hergestellt, die es erlaubt, beliebige Transgene in das Genom der Maus zu integrieren und durch Doxyzyklin, welches beispielsweise mit dem Trinkwasser verabreicht werden kann, zu

induzieren⁹⁶. Das System eignet sich zur Überexpression von Transgenen und zum Abschalten von Genen durch geeignete RNA-Interferenzkonstrukte. Um das System eingehend zu testen, wurde grün-fluoreszierendes Protein (GFP) als Transgen in die Maus eingebracht, sowie mehrere Gene durch RNA-Interferenz im Mausembryo inaktiviert.

Die Arbeit Vidigal et al. (2010) beschreibt die Entwicklung und den erfolgreichen Test des Transgensystems. Der *Gt(ROSA26)Sor*-Lokus ist bekanntermaßen als Integrationsort für Transgene im Mausgenom geeignet, da er in allen Entwicklungsstufen aktiv ist, und der Verlust eines oder beider Allele durch Transgeninsertion vom Organismus toleriert wird⁹⁷. Wir haben daher eine Transgenplattform in *Gt(ROSA26)Sor* von murinen embryonalen Stammzellen (mES Zellen) integriert. Diese besteht aus einem konstitutiv exprimierten tetrazyklin-abhängigen reversen transkriptionellen Aktivator (rtTA) oder einem tetrazyklin-abhängigen Repressor-Protein⁹⁸, der vom universell aktiven *Gt(ROSA26)Sor*-Promoter kontrolliert wird. Jenseits des Polyadenylierungssignals dieses Transkripts wird der genomische Lokus durch einen genomischen Isolator aus dem β -Globin-Lokus des Huhns abgeschirmt. Darauf folgt eine von loxA-abgeleiteten Erkennungssequenzen flankierte Einsprungkassette, die durch kurzzeitige Expression von Cre Rekombinase gegen ein beliebiges Transgen, welches von kompatiblen loxA-Varianten flankiert wird, ausgetauscht werden kann⁹⁹. Zunächst wurde gezeigt, dass ein Transgen in dieser Konfiguration in mES-Zellen durch Zugabe von Doxyzyklin ins Medium aktiviert und durch Auswaschend des Doxyzyklins wieder deaktiviert werden kann. Eine solche Induktion war auch in Mausembryonen durch Zugabe von Doxyzyklin ins Trinkwasser der Mutter erfolgreich. Danach wurden mehrere Gene, nämlich die der entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktoren *Brachyury (T)*, *Noto* und *Foxo*, im Mausembryo durch RNA-Interferenz-Transgene inaktiviert. Der Vergleich dieser induzierbaren Mausmodelle mit den jeweiligen Knockout-Modellen zeigte je nach Konfiguration entweder einen kompletten Funktionsverlust oder eine graduelle Minderfunktion des jeweiligen Faktors. Induktion während der Embryonalentwicklung führte zur Entdeckung von zusätzlichen Funktionen von *Brachyury*, die mit herkömmlichen Mausmodellen nicht offenbar wurden¹⁰⁰.

Diese Vorarbeiten zeigten, dass das induzierbare Transgensystem geeignet ist, neue Funktionen von Genen in der Entwicklung zu erforschen. Daher setzten wir dieses

experimentelle Transgensystem in der Folgezeit auch ein, um Funktionen von Onkogenen im Darmkrebsgeschehen im adulten Organismus zu untersuchen. Zu diesem Zweck kann ein beliebiges Onkogen als induzierbares Transgen in das Genom von mES Zellen integriert werden und anschließend eine Mauslinie aus den so modifizierten mES Zellen abgeleitet werden. Das Onkogen kann anschließend durch Doxozyklin in der resultierenden induzierbaren transgenen Maus aktiviert werden. Dabei kann jedoch, zumindest mit dem bestehenden System, die Expression nicht auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt werden. Daher haben wir das Transgensystem für bestimmte Versuche mit einer dreidimensionalen Zellkulturtechnik, der sogenannten organotypischen Zellkultur, kombiniert. Für diese Zellkulturtechnik werden primäre Zellen und Gewebe in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix so kultiviert, dass die Zellhierarchie des Gewebes erhalten bleibt. Im Falle des Darmepithels proliferieren also intestinale Stammzellen beständig unter Hervorbringung von proliferativen undifferenzierten Vorläuferzellen. Diese wiederum differenzieren zu Enterozyten, zu sekretorischen Zellen des Villus und zu Paneth-Zellen der Krypte, die im Dünndarm den epithelialen Teil der Stammzellnische bilden. So wird in einer Lamininmatrix, unter Zugabe von nur wenigen Wachstumsfaktoren (R-Spondin als Wnt/ β -Catenin-Ko-Ligand, EGF als Proliferationssignal und NOGGIN als BMP-Signal-hemmendes Anti-Differenzierungssignal) die komplette Hierarchie des Darmepithels nachgebildet^{101,102}. Im Unterschied zu etablierten Zelllinien bleiben wichtige Funktionen des Organs im kultivierten Organoid erhalten.

In Farrall et al. (2012) wurde organotypische Kultur des Darmepithels mit einem induzierbaren Transgen, welches onkogen mutiertes β -Catenin (β -Catenin^{onc}) und einen fluoreszenten Marker exprimiert, kombiniert, um die Initiation von Adenomen zu untersuchen. Als Kontroll-Mausmodell für die Adenominitiation diente hierbei die APC^{Min}-Maus. Zunächst wurde Normaldarm mit Adenom, und Normaldarm-organoid mit entsprechenden organotypischen Kulturen von Adenomen, sogenannten Spheroïden, verglichen. Genexpressionsanalysen legten nahe, dass charakteristische Eigenschaften von Normaldarm und Adenom in organotypischer Kultur erhalten blieben. Interessanterweise zeigten adenomatöse Spheroïdzellen in funktionellen Tests Stammzeleigenschaften. Diese Eigenschaften konnten von keinem Zelltyp des Normalepithels kopiert werden – auch nicht von Darm-Stammzellen, da diese die unmittelbare Nachbarschaft einer Paneth-Zelle als Stammzellnischen-Zelle benötigen.

Sodann wurde der Effekt von transgenen β -Catenin^{onc} in organotypischer Darmepithelkultur untersucht. Wir konnten zeigen, dass onkogenes β -Catenin unmittelbar zur kollektiven Konversion von Organoiden zu adenom-typischen Spheroïden führt. Diese transgenen Spheroïde wiesen alle Eigenschaften von Spheroïden auf, die aus Adenomen gewonnen wurden. Insbesondere war der Grad der Stammzellidentität von transgenen Spheroïdzellen von der Stärke der transgenen β -Catenin-Expression abhängig. Diese Versuche zeigen also eindrucksvoll, dass eine aktivierende Mutation im Wnt/ β -Catenin-Signalweg für die Adenominitiation hinreichend ist. Ein weiterer Beweis für die Erlässlichkeit zusätzlicher Mutationen zur Bildung von adenomatösen Zellen zeigte ein Reversionsversuch, in dem das initiiierende Onkogen β -Catenin^{onc} in einer reinen Spheroïdkultur inaktiviert wurde: Unmittelbar nach Abschalten des Transgens bildeten die Adenomzellen normale Hierarchien aus Darmstammzellen, proliferativen Vorläuferzellen und differenzierten Zelltypen von Villus und Krypte. Somit enthielten die Adenomzellen keinerlei zusätzlichen genetischen oder epigenetischen Veränderungen, die der Reversion zu Normalgewebe im Wege gestanden hätten. Insgesamt führten die Versuche zu der Erkenntnis, dass zelluläre Hierarchien im Darmtumor plastischer sind als bisher angenommen. Unsere Befunde sind in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die ebenfalls Tumorzellen identifiziert haben, die zwischen Zuständen mit unterschiedlichem Entwicklungspotenzial wechseln können^{92,103,104}.

Ein weiterer Aspekt der oben genannten Versuche ergab sich bei der Auswertung der Wachstumsfaktorprofile der Adenomzellen. Diese produzieren nicht nur, wie erwartet, zahlreiche stammzellspezifischen Wachstumsfaktoren, sondern auch BMP4, welches im Darmepithel zur Zelldifferenzierung führt. Dies warf die Frage auf, ob es eine limitierende Rolle von BMP-Signalen im Adenomgeschehen gibt. Untersuchungen von APC^{Min}-Maus-Adenomen ergab, dass diese Zonen mit hoher und niedriger BMP-Signaltransduktion enthalten. Die Zonen mit niedrigem BMP-Signalniveau fanden sich basal (in Richtung der Darmkrypten) und waren durch Expression von Tumor-Stammzellmarkern charakterisiert, während die apikalen, d.h. zum Darminneren gerichteten, Regionen mit hohem BMP-Signalniveau keine solche stammzelltypische Genexpression aufwiesen. Versuche an organotypischen Zellkulturen konnten zeigen, dass endogene und exogene BMP-Signale zur Differenzierung von Spheroïdzellen beitragen. Wurde in diesen Versuchen eine gewisse BMP-Signalstärke überschritten,

differenzierten Spheroidzellen irreversibel. Zusammengefasst legen diese Befunde nahe, dass das Schicksal von Adenomzellen durch das Spannungsfeld von stammzellerhaltenden Wnt- und differenzierenden BMP-Signalen bestimmt wird. Eine bisher unerkannte Rolle von BMP-Signalen könnte darin liegen, das Adenomwachstum zu limitieren.

3. Epigenetische Analyse von Darmkrebs in Maus und Mensch

Grimm C, Chavez L, Vilardell M, Farrall AL, Tierling S, Böhm, JW, Grote P, Lienhard M, Timmermann B, Walter J, Schweiger MR, Lehrach H, Herwig R, Herrmann BG, **Morkel M**. DNA-Methylome analysis of mouse intestinal adenoma Identifies a tumour-specific signature that is partly conserved in human colon cancer **PLoS Genetics** 2013 Feb 7; 10.1371/journal.pgen.1003250

[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003250](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003250)

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Versuche zeigten, dass eine einzige Mutation im Wnt/ β -Catenin-Signalweg ausreicht, um das adenomatöse Wachstum im Maudarm zu initiieren. Insofern ist die APC^{Min}-Maus ein geeignetes Modell, um die epigenetischen Veränderungen zu untersuchen, die mit der Adenomentstehung einhergehen. Wir haben daher in Grimm et al. (2013) die massiv-parallele Sequenzierung immunpräzipitierter methylierter DNA (MeDIP-Seq)¹⁰⁵ als Methode gewählt, um genomweite Methylierungsmuster im Normaldarm mit denen in Adenomen zu vergleichen. Der Vergleich von sechs Profilen aus Normaldarm (davon drei aus tumoranfälligen APC^{Min}-Mäusen) und fünf Adenomprofilen von jungen (3-4 Monate alten) Mäusen ergab, dass mehr als 13000 genomische Orte Methylierungsunterschiede zwischen Normaldarm und Adenom aufwiesen. Einige dieser differenziell methylierten Regionen (DMRs) wurden mit weiteren Methoden in den ursprünglichen und in weiteren unabhängigen Normaldarm- und Adenomen-Proben untersucht, und so die Spezifität der genomweiten Analysen sichergestellt.

Wie wird dieses adenom-spezifische Methylierungsmuster unmittelbar nach dem Verlust des Tumorsuppressors APC etabliert? Die nachfolgenden Analysen konnten diese Frage teilweise klären. In parallel (durch massiv-parallele Sequenzierung von RNA) erhobenen Genexpressionsprofilen wurde festgestellt, dass zahlreiche Komponenten des Polycomb-Repressor-2-Komplexes (PRC2), sowie der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b überexprimiert sind. Hypermethylierte DMRs waren wiederum signifikant mit bekannten PRC2-Bindungsstellen assoziiert. In der Tat fand sich die spezifische H3K27me3-Histonmodifizierung an den meisten untersuchten hypermethylierten DMRs. Adenomspezifische fokale Hypermethylierung ist also wahrscheinlich häufig eine Folge

der deregulierten Polycomb- und DNA-Methyltransferasenaktivität im Adenom. Eine ähnliche Assoziation zwischen fokaler Hypomethylierung und der Deregulierung eines epigenetischen Effektor-Komplexes konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Eine weitere Frage nach der Herkunft epigenetischer Veränderungen wurde bislang im Forschungsfeld vernachlässigt: Werden epigenetische Veränderungen in Tumorzellen neu etabliert, oder stellt das in Tumoren gefundene Muster (wenigstens teilweise) ein ererbtes Spezifikum der Tumor-Ausgangszelle dar? Im APC^{Min}-Modell ließ sich diese Frage beantworten. Frühere Forschungen aus der Arbeitsgruppe von Hans Clevers haben gezeigt, dass Darmadenome in der Maus aus *Lgr5*-positiven intestinalen Stammzellen hervorgehen⁵². Durch den Einsatz einer transgenen *Lgr5*-Reportermaus mit grün-fluoreszenten intestinalen Stammzellen⁵¹ konnten wir reine Populationen dieser Tumor-Ausgangszellen durch fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung gewinnen und so stammzellspezifische Methylierungsmuster mit denen des Adenoms vergleichen. Zusätzlich reinigten wir proliferative und differenzierte epitheliale Zellpopulationen auf. Ein Vergleich von Methylierungsintensitäten mehrerer DMRs ergab eindeutig, dass Stammzellen, proliferierende Zellen, differenzierte Zellen und (Gesamt-)Normaldarm ein relativ einheitliches DNA-Methylierungsmuster zeigten, Adenome hingegen ein abweichendes. Das im Adenom gefundene Methylierungsmuster ist also nicht ein Stammzellmuster, welches im Adenom expandiert vorliegt, sondern ein neu-etabliertes Spezifikum der Tumorzelle.

Welche Auswirkungen hat das tumorspezifische Methylierungsmuster nun auf die Genaktivität der Adenomzelle? In genomweiten Vergleichen fanden sich nur wenige Gene, deren Aktivität regelhaft mit dem veränderten Methylierungsmuster korrelierte. Insbesondere scheint die Inaktivierung von Tumorsuppressoren durch Hypermethylierung in den untersuchten frühen Adenomen sehr selten zu sein. Eine eingehende Analyse von 31 Tumorsuppressorgenen die laut Literaturlage im Kolonkarzinom durch Hypermethylierung abgeschaltet werden, zeigte nur in zwei Fällen (*Crabp1* und *Runx3*) sowohl Hypermethylierung des Promotors als auch geringere Genexpression.

Zusammengenommen legen unsere Daten also nahe, dass sich Änderungen des DNA-Methyl-Epigenoms im Verlauf der Tumorentstehung und -progression in zwei Phasen einteilen lassen: Unmittelbar nach der Tumorentstehung wird im Adenom ein stereotypes

Muster etabliert. Dies ist, zumindest für hypermethylierte DMRs, die Folge von gesteigerter Aktivität von PRC2 und anderen epigenetischen Regulatoren, wie z.B. DNA-Methyltransferasen. Diese frühen Ereignisse gehören zur ersten Phase. Weitere funktionell wichtige Veränderungen, wie zum Beispiel Abschaltung von Tumorsuppressoren werden jedoch in einer zweiten, späteren Phase etabliert und können daher in frühen Adenomen nicht gefunden werden. Wir postulieren, dass diese, ähnlich wie genetische Mutationen, stochastisch und damit selten auftreten, aber dem betroffenen Zellklon einen Selektionsvorteil innerhalb des Tumors bieten. So breiten sich seltene epigenetische Veränderungen in Tumorsuppressoren durch Mutation und Selektion nach und nach im Tumor aus und tragen zur Tumorprogression bei.

Zuletzt stellten wir die Frage, ob sich die Ergebnisse aus dem Mausmodell auch auf den Menschen übertragen lassen. Um dies zu evaluieren, untersuchten wir vierzehn Paare aus Normalgewebe und Kolonkarzinom menschlicher Patienten mittels MeDIP-Seq. Wir fanden, dass sowohl hypermethylierte als auch hypomethylierte DMRs in den menschlichen Methyl-DNA-Profilen signifikant konserviert waren. Da wir hier frühe intestinale Adenome der Maus mit weit fortgeschrittenen Kolonkarzinomen des Menschen (der Stufen T3 und T4) verglichen haben, scheint es sich bei den konservierten Biomarkern um universelle epigenetische Änderungen zu handeln. Wir haben daher die Hoffnung, dass sich diese hochkonservierten Änderungen in der Zukunft als Marker für die Früherkennung intestinaler Tumorerkrankungen einsetzen lassen.

III. Diskussion und Ausblick

1. Onkogenwirkungen im Darmepithel

Die in den vorangestellten Kapiteln dargestellten Versuche untersuchen genetische und epigenetische Veränderungen in Darmtumorzellen und versuchen, Verbindungen zwischen onkogener Aktivierung und zellulärem Phänotyp zu ziehen. So konnte mit Hilfe eines Mausmodells gezeigt werden, dass eine einzige Mutation, nämlich Aktivierung von onkogenem β -Catenin, ausreicht, um zentrale funktionelle Attribute des frühen Adenoms in unmutierten primären Darmepithelzellen hervorzurufen. In der Tat konnten die β -Catenin-transgenen Zellen in verschiedenen Experimenten nicht von Adenomzellen aus APC^{Min}-Mäusen unterschieden werden: Transgene Zellen aus induziertem Normalepithel und Adenomzellen zeigen gleichermaßen ein unbegrenztes proliferatives Potential, konnten *in vitro* neue adenomatöse Strukturen initiieren und hatten vergleichbare Genexpressionsmuster. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist also hinreichend zur Auslösung von adenomatösem Wachstum im Darmepithel. Es ist jedoch beachtenswert, dass die so entstandenen Zellen keine Krebszellen sind – zwar können sie unter bestimmten Umständen ohne festen Untergrund (also *anchorage independent*) wachsen, sie benötigen aber ein definiertes Milieu von Wachstumsfaktoren zur Aufrechterhaltung des Wachstums. Abweichungen in der Zusammensetzung des Mediums oder Zugabe von differenzierenden Wachstumsfaktoren wie BMP4 führten zu Apoptose oder zu terminaler Differenzierung. Im Bezug auf die von Hanahan und Weinberg definierten *hallmarks of cancer*⁸ ist also festzuhalten, dass die durch eine einzelne Mutation hergestellten Adenomzellen zwar unendliches replikatives Potenzial und Selbstgenügsamkeit in Bezug auf zahlreiche Wachstumssignalwege aufwiesen, aber nach wie vor intakte und aktivierbare Apoptose- und Differenzierungsprogramme besaßen. Dieses Ergebnis erscheint nachvollziehbar, da frühere Versuche in menschlichen und in Nagerzellen zeigten, daß stets mehrere Mutationen notwendig sind, um normale diploide Zellen in Krebszellen umzuwandeln²⁰⁻²².

Der gewählte Ansatz, nämlich die Überexpression einzelner Onkogene im Darmepithel, erscheint aufgrund der bisherigen Ergebnisse geeignet, um weitere Schlüsselmutationen im Darmkrebsgeschehen genetisch isoliert, aber dennoch im Gewebekontext zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden bereits Mausmodelle hergestellt, die

induzierbare Mutationen der Onkogene *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* einzeln und in Kombination tragen. Die Analyse dieser Modelle zielt auf die Beantwortung folgender Fragen: Verhalten sich alternative Onkogene im MAPK-Signalweg (*KRAS* und *BRAF*) ähnlich oder haben sie alternative Funktionen? Es erscheint wahrscheinlich, dass verschiedene Regulationsmechanismen wie z. B. negative *feedback*-Schleifen verschiedene onkogene Signale innerhalb der Kaskade unterschiedlich gut ausgleichen können. Können Mutationen im MAPK-Signalweg nur nach der *gatekeeper*-Mutation in *APC* oder *CTNNB1* ihre Wirkung entfalten, oder können sie auch als initiiierende Mutation in alternativen Tumorentstehungswegen, wie z.B. für serratierte Adenome, wirken? Wie wirken Mutationen in den beiden Hauptsignalwegen unterhalb von Rezeptortyrosinkinasen, nämlich MAPK und PI3K/AKT, zusammen? Eine vorläufige Begutachtung des Darmepithels der genannten transgenen Mausmodelle nach Transgeninduktion lässt bereits den Schluss zu, dass die transgene Aktivierung einzelner Onkogene zu phänotypischen Veränderungen führt, die denen in bestimmten Subgruppen von Darmtumoren gleichen. Obwohl eine vollständige onkogene Transformation bekanntlich synergistische Aktivierung mehrerer Onkogene und den Verlust mehrerer Tumorsuppressoren benötigt, können also tumor-assoziierte Phänomene durch diesen reduktionistischen Ansatz isoliert beobachtet und einzelnen Onkogenen zugeordnet werden.

Die Methode der dreidimensionalen organotypischen primären Gewebekultur¹⁰⁶ erlaubt zudem, Effekte von Therapeutika (z.B. von kleinmolekularen Kinaseinhibitoren) in Abhängigkeit von bestimmten Onkogenen auf Primärzellen zu untersuchen. Im Gegensatz zu Untersuchungen an etablierten Zelllinien können so auch Effekte auf Zellhierarchien erfasst werden. Zudem erlauben isogene Primärzellkulturen besser als konventionelle Zellkulturlinien einzelne Parameter der Zellkultur experimentell voneinander zu trennen, wie beispielsweise Effekte von aktivierten Onkogenen und Einflüsse des Hintergrundgenoms. Zusammenfassend scheinen die in Untersuchung befindlichen gestellten Mausmodelle geeignet, um wichtige präklinische Erkenntnisse zu liefern und so zahlreiche Detailfragen zur Wirkung einzelner Onkogene im Darmepithel zu beantworten.

2. Identifizierung einer prognostischen Signatur für fortgeschrittene Kolonkarzinome

Die gleichzeitige Aktivierung zahlreicher Onkogene im Darmkrebsgeschehen schlägt sich insbesondere in Änderungen des Tumorzell-spezifischen Transkriptoms nieder. Trotz der ursprünglich grundlagenwissenschaftlichen Ausrichtung stellt sich daher für die Genexpressionsanalysen in Fritzmann et al. (2009) die Frage, ob die gewonnenen Daten im klinischen Kontext die Rolle von prognostischen Biomarkern übernehmen könnten. In der ursprünglichen Arbeit wurden 41 fortgeschrittene Primärtumoren sowie 50 Metastasen in Gruppen eingeteilt und analysiert. Ziel der Analyse war in erster Linie die Identifikation von Genen, deren Expressionsstärke eine Gruppe (z.B. metastasierende Primärtumoren) von einer anderen (z.B. nicht-metastasierende Primärtumoren) unterscheidet. Diese Zielrichtung in der Analyse von Genexpressionsmustern wird gemeinhin als *class prediction* bezeichnet und dient der Identifizierung neuer prognostischer oder prädiktiver Tumormarker⁸⁶. Prognostische Marker sollen hierbei Informationen über den Verlauf einer (unbehandelten) Tumorerkrankung liefern, während prädiktive Marker Erfolgswahrscheinlichkeiten verschiedener Behandlungsalternativen aufzeigen sollen. Microarraytechnologien wurden bereits früh zur Identifizierung von prognostischen und prädiktiven Markern verwendet⁸⁶. Prognostische Microarray-Signaturen haben beispielsweise entscheidend zur Neuklassifizierung von Blutkrebs beigetragen, und gaben in diesem Zusammenhang Hinweise auf bisher unbekannte Untergruppen mit unterschiedlicher klinischer Perspektive (diese Analyse ist also ein *class discovery*-Anwendung)^{86,87}. Die Identifizierung prognostischer Marker bei soliden Tumoren erwies sich jedoch als schwieriger^{88,107}. Zum einen ist die Gewinnung von geeignetem Ausgangsmaterial für die Markeranalyse problematisch, da solide Tumore heterogen sind und aus verschiedenen Zelltypen, beispielsweise Stromazellen, Zellen des Immunsystems, Endothelzellen und Tumorzellen bestehen. Zudem zeigen verschiedene Teile eines Tumors, wie zum Beispiel zentrale Areale und Invasionsfronten unterschiedliche Zellmorphologie und Aktivitäten von Signalwegen^{104,108}. Anhand einer einzelnen Biopsie ist eine Zuordnung des Materials zu einem bestimmten Tumorareal oft nicht eindeutig möglich. Weiterhin existieren innerhalb einer scheinbar homogenen Gruppe von Karzinomen oft bereits bekannte Unterteilungen, so beim Kolonkarzinom anhand von Lokalisation (proximale versus distale Lage im Kolon), (epi-)genetischen Besonderheiten (z.B. *CpG island*

methylator phenotype; = CIMP), genomischer Stabilität (MSS versus MSI) oder Progressionswegen (konventionell versus serratiert)¹⁰⁹. Die massiv-parallele Analyse von Genaktivitäten mit dem Ziel der Biomarker-Identifikation ist daher einer Vielzahl von Störfaktoren unterworfen.

Die verschiedenen Arbeiten zu prognostischen Signaturen in Darmkrebs haben zudem in der Vergangenheit Kritik auf sich gezogen, da Studien mit ähnlicher Fragestellung in der Identifizierung von kaum überlappenden Gensignaturen resultierten. Dies wurde als Resultat von zu kleinen Studienkohorten in Verbund mit mangelhafter Fehlerkorrektur angesehen^{110,111}. In der Tat operierten viele Genexpressionsstudien beim kolorektalen Karzinom mit geringen Fallzahlen, und verschiedene prognostische Signaturen unterschieden sich stark. Im weiteren Sinne zählt dazu auch die hier vorgestellte Arbeit von Fritzmann und Morkel et al. (2009), in der wir eine Signatur für Metastasierung von Darmkrebs zu etablieren versuchten. In jüngster Zeit wurden jedoch mehrere Metaanalysen von Darmkrebs-Genexpressionsprofilen publiziert, die mit großen Fallzahlen operieren¹¹²⁻¹¹⁴. Diese Studien versuchten zunächst eine freie Klassifizierung von Kolonkarzinomen in verschiedene Subtypen (*class discovery*), um in einem weiteren Schritt prognostische und prädiktive Einteilungen abzuleiten (*class prediction*). Interessanterweise zeigt die Studie von De Sousa e Melo et al. (2013)¹¹³, dass die in Fritzmann und Morkel et al. (2009) definierte Gensignatur für Metastasierung tatsächlich eine gute Klassifizierung von Kolonkarzinomen in solche mit guter und schlechte Prognose erlaubt und weitgehend mit der dort definierten Hochrisikogruppe CCS3 korreliert. Eine solche unabhängige Validierung konnte auch für eine Vielzahl von anderen bereits publizierten prognostischen Signaturen geleistet werden. Insgesamt lässt dieser Befund den Schluss zu, dass viele der publizierten prognostischen Signaturen Teile eines molekularen Phänotyps repräsentieren, der sich in einer schlechten Prognose niederschlägt. Eine weitergehende Analyse in De Sousa e Melo et al. (2013) konnte zeigen, dass dieser Phänotyp mit einem besonderen Progressionsweg, nämlich über serratierte Polypen, assoziiert sein könnte. Dennoch stehen einer breiten klinischen Anwendung von RNA-Signaturen zur Prognose wichtige praktische Gründe entgegen, so beispielsweise die Frage nach einer reproduzierbaren Gewinnung von vergleichbarem Tumormaterial, sowie die Instabilität von RNA im Gewebe, und damit verbundenen Schwankungen im Assay.

Aus einer funktionell-mechanistischen Perspektive erscheint die Expression von prognostischen Signaturen als direktes oder indirektes Resultat der gleichzeitigen Aktivierung mehrerer onkogener Signalwege durch bestimmte Mutationen. Daher erscheint es plausibel, Prognosen über Krankheitsverlauf oder Therapieerfolg nicht anhand der RNA von Markergenen zu bestimmen, sondern direkt anhand des Mutationsmusters der Tumorzellen. Bereits in der Jetztzeit haben einige tumorspezifische Mutationen eine prädiktive Bedeutung erlangt, so z.B. der *BRAF^{V600E}*-Mutation in malignen Melanomen und *KRAS*-Mutationen im kolorektalen Karzinom. Diese Mutationen indizieren oder kontraindizieren bestimmte Therapieformen (Vemurafenib bei *BRAF^{V600E}*-positiven Melanomen; Cetuximab bei *KRAS*-wildtypischen Kolonkarzinomen). Moderne Sequenziertechniken, die die beinahe vollständige Erfassung der Mutationsmuster im Krebs ermöglichen, erscheinen daher als die vielversprechendste Methode, Tumoren prognostisch oder prädiktiv einzuteilen. Von besonderer Bedeutung könnte hier in Zukunft die Bestimmung von Mutationsmustern aus dem Blut des Patienten sein, die sogenannte *liquid biopsy*¹¹⁵. Diese Technik bietet, gerade für frühe Tumorstadien, noch keine ausreichende Sensitivität, würde aber eine elegante Lösung für das oben angesprochene Problem der Tumorheterogenität bieten. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die genomweite Bestimmung von Genaktivitäten durch Microarrays oder RNA-Seq zwar eine große grundlagenwissenschaftliche Bedeutung hat, aber im Bereich der klinischen Diagnostik mit zahlreichen Problemen behaftet ist.

3. Epigenetische Signaturen als diagnostische Biomarker

Eine besondere Rolle für die translationale Tumorforschung könnte unser Befund von konservierten epigenetischen Veränderungen in der frühen Darmkrebsentstehung spielen. Früherkennung von Darmtumoren beruht nach heutigem Stand der medizinischen Praxis überwiegend auf der Koloskopie, d.h. der Darmspiegelung. Diese Prozedur ist effektiv¹¹⁶, aber erreicht nur einen kleinen Teil der Bevölkerung. Alternative Untersuchungsmöglichkeiten aus Blut- oder Stuhlproben könnten weitere Teile der Bevölkerung erreichen, aber erreichen bisher nicht die Sensitivität und Spezifität der Koloskopie^{69,117}. Die Identifizierung weiterer molekularer Biomarker zur Verbesserung solcher Bluttests erscheint daher geboten. Als molekulare diagnostische Marker, die aus Körperflüssigkeiten bestimmbar sind, kommen prinzipiell verschiedene

Moleküle in Frage, beispielsweise bestimmte Proteine, microRNAs/mRNAs oder bestimmte Besonderheiten von genomischer Tumor-DNA, etwa Mutationen oder epigenetische Besonderheiten. Wie schon weiter oben erwähnt, sind RNA-Moleküle in Blut und Gewebe instabil und in der praktischen Handhabung daher für diagnostische Assays oft nicht geeignet. Das Vorhandensein von bestimmten Proteinen im Blut von Patienten, wie z.B. CEA, CK19, CK20 und anderen wurde in verschiedenen Studien auf eine Eignung als prognostische Biomarker untersucht. In diesen Studien erreichten einzelne oder Kombinationen von verschiedenen Proteinen oft keine ausreichende Sensitivität oder Spezifität. Dasselbe gilt für die Früherkennung. Da beinahe alle krebsassoziierten Mutationen eher mit Subgruppen von Tumoren assoziiert sind, aber selten regelmäßig auftauchen, scheiden auch diese als diagnostische Biomarker für die Früherkennung aus. Unser Befund von konservierten epigenetischen Ereignissen während der Darmkrebsinitiation könnte auf eine Eignung von epigenetischen Besonderheiten von Tumorzellen zur Früherkennung hindeuten. Wir untersuchen daher nun eine Reihe von hypermethylierten epigenetischen Markern, die zwischen Maus und Mensch konserviert sind, um ihre Eignung als Früherkennungsmarker zu validieren. Es erscheint vorstellbar, dass die Konservierung von epigenetischen Markern in der Tumorentstehung über etwa 75 Millionen Jahre divergenter Evolution zwischen Maus und Mensch ein wichtiges Kriterium darstellt, um spezifische und sensitive diagnostische Biomarker zu identifizieren.

IV. Zusammenfassung

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift fasst mehrere Arbeiten zur Signaltransduktion im normalen und transformierten Darmepithel zusammen. Dabei werden verschiedene Modellsysteme und Techniken verwendet. Microarray-basierte Genexpressionsanalysen an fortgeschrittenen Kolonkarzinomen dienen zur Identifikation einer Genexpressionssignatur, die typisch für metastasierende Kolonkarzinome ist. Eine eingehende funktionelle Analyse des BAMBI-Genproduktes, das durch β -Catenin kontrolliert wird und für einen negativen Regulator des TGF- β -Signalweges kodiert, konnte zeigen, dass Teile der identifizierten Signatur eine funktionelle Bedeutung in der Regulation von Zellmotilität und Metastasierung haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass die metastasierungsspezifische Genexpressionssignatur signifikant mit einem neu entdeckten Genaktivitätsmuster mit negativer prognostischer Bedeutung überlappt. Die erwähnten Genexpressionsanalysen wurden in weiteren Arbeiten herangezogen, um Aktivitätsmuster von MAPK-Zielgenen und Komponenten des FGF-Signalweges mit dem Überleben von Patienten zu korrelieren.

In einem weiteren Teil wurden induzierbare Mausmodelle generiert, die dazu geeignet sind, einzelne Onkogene im Darmepithel reversibel zu aktivieren. Die Analyse von transgenen Mäusen mit induzierbarem onkogenem β -Catenin zeigte die zentrale Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Die transgene Aktivierung von β -Catenin führte zur Konversion normaler Darmepithelzellen in solche Zellen, die funktionell identisch mit Adenomzellen sind. Diese Zellen zeigen starke Aktivität von proliferations- und (tumor-)stammzellassoziierten Genen, und –in geeignetem Medium– weitgehend inaktive Differenzierungsmarker. Zugabe des Wachstumsfaktors BMP4 konnte diese Zellen jedoch irreversibel differenzieren. Inaktivierung des onkogenen β -Catenin-Transgenes führte zu einer Reversion der Adenom-ähnlichen Zellen zu intestinalen Stammzellen, die anschließend wieder eine normale Zellhierarchie etablierten.

Eine genomweite Analyse des Methyl-DNA-Epigenoms von frühen Darmadenomen der der APC^{MIN} Maus führte zu der Erkenntnis, dass die Aktivierung des β -Catenin-Signalweges auch unmittelbare Auswirkungen auf das genomische Methylierungsmuster der Tumorzellen hat. Überraschenderweise fand sich in frühen Darmadenomen der Maus ein komplexes und stereotypes Muster von vielen tausend epigenetischen Veränderungen. Ein Teil dieser Modifikationen, nämlich

Hypermethylierung zahlreicher genomischer Abschnitte, wird offenbar durch die gesteigerte Aktivität von Polycomb-Komplexen und DNA-Methyltransferasen im Adenom gesteuert. Ein Vergleich mit Kolonkarzinomen des Menschen zeigte einen hohen Grad der Konservierung des neu entdeckten epigenetischen Musters zwischen Maus und Mensch. Die Studie könnte daher auf diagnostisch bedeutsame konservierte epigenetische Marker hinweisen.

V. Referenzen

1. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095–2128 (2012).
2. Knudson, A. G., Meadows, A. T., Nichols, W. W. & Hill, R. Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med* **295**, 1120–1123 (1976).
3. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
4. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* **12**, 68–78 (2012).
5. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* **361**, 123–134 (2009).
6. Balmain, A. Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* **108**, 145–152 (2002).
7. Lynch, H. T., Shaw, T. G. & Lynch, J. F. Inherited predisposition to cancer: a historical overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129C**, 5–22 (2004).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
9. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
10. STEHELIN, D., VARMUS, H. E., BISHOP, J. M. & Vogt, P. K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170–173 (1976).
11. Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C. & Weinberg, R. A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* **297**, 474–478 (1982).
12. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789–799 (2004).
13. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459–465 (2003).
14. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* **11**, 761–774 (2011).
15. Kern, S. *et al.* Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708–1711 (1991).
16. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53 (1991).
17. Huang, H. J., Yee, J. K., Shew, J. Y., Chen, P. L. & Bookstein, R. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* (1988).
18. Hahn, W. C. *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464–468 (1999).
19. Elenbaas, B. *et al.* Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* **15**, 50–65 (2001).
20. Ruley, H. E. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602–606 (1983).
21. Land, H., Parada, L. F. & Weinberg, R. A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596–602 (1983).
22. Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D. & Rotter, V. Cooperation between

- gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**, 649–651 (1984).
23. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**, 783–792 (2001).
 24. Rosell, R. *et al.* Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* **361**, 958–967 (2009).
 25. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* **347**, 472–480 (2002).
 26. Flaherty, K. T. *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 809–819 (2010).
 27. Druker, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408–2417 (2006).
 28. Brugger, W. & Thomas, M. EGFR-TKI resistant non-small cell lung cancer (NSCLC): New developments and implications for future treatment. *Lung Cancer* **77**, 2–8 (2012).
 29. Misale, S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**, 532–536 (2012).
 30. Thakur, Das, M. *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* **494**, 251–255 (2013).
 31. Diaz, L. A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486**, 537–540 (2012).
 32. Waddington, C. H. *The strategy of the genes.* (1957).
 33. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635–638 (2007).
 34. Cedar, H. & Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10**, 295–304 (2009).
 35. Margueron, R. & Reinberg, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* **11**, 285–296 (2010).
 36. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148–1159 (2008).
 37. Tsai, H.-C. & Baylin, S. B. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* **21**, 502–517 (2011).
 38. Goetz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R. & Feinberg, A. P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228**, 187–190 (1985).
 39. Feinberg, A. P., Gehrke, C. W., Kuo, K. C. & Ehrlich, M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res.* **48**, 1159–1161 (1988).
 40. Silverman, A. L. *et al.* Abnormal methylation of the calcitonin gene in human colonic neoplasms. *Cancer Res.* **49**, 3468–3473 (1989).
 41. Vertino, P. M., Spillare, E. A., Harris, C. C. & Baylin, S. B. Altered chromosomal methylation patterns accompany oncogene-induced transformation of human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* **53**, 1684–1689 (1993).
 42. Holst, C. R. *et al.* Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res.* **63**, 1596–1601 (2003).
 43. Suzuki, H. *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **36**, 417–422 (2004).
 44. Akiyama, Y. *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and

- gastric cancer. *Mol Cell Biol* **23**, 8429–8439 (2003).
45. Fearon, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **6**, 479–507 (2011).
 46. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
 47. Rubinfeld, B. *et al.* Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* **262**, 1731–1734 (1993).
 48. Su, L. K., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* **262**, 1734–1737 (1993).
 49. van de Wetering, M. *et al.* The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**, 241–250 (2002).
 50. Gaspar, C. & Fodde, R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol* (2004).
 51. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).
 52. Barker, N. *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608–611 (2009).
 53. Segditsas, S. & Tomlinson, I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* **25**, 7531–7537 (2006).
 54. Seshagiri, S. *et al.* Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* **488**, 660–664 (2012).
 55. Sjöblom, T. *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**, 268–274 (2006).
 56. Wood, L. D. *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108–1113 (2007).
 57. Greenman, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153–158 (2007).
 58. Schwitalla, S. *et al.* Loss of p53 in Enterocytes Generates an Inflammatory Microenvironment Enabling Invasion and Lymph Node Metastasis of Carcinogen-Induced Colorectal Tumors. *Cancer Cell* **23**, 93–106 (2013).
 59. Baylin. Stem cells, cancer, and epigenetics. *StemBook* 1–14 (2009). doi:10.3824/stembook.1.50.1
 60. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286–298 (2007).
 61. Laiho, P. *et al.* Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene* **26**, 312–320 (2007).
 62. Kim, Y. H., Kakar, S., Cun, L., Deng, G. & Kim, Y. S. Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer* **123**, 2587–2593 (2008).
 63. Velho, S. *et al.* BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* **8**, 255 (2008).
 64. Schreiberman, I. R., Baker, M., Amos, C. & McGarrity, T. J. The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 476–490 (2005).
 65. Greene, F. L. TNM staging for malignancies of the digestive tract: 2003 changes and beyond. *Semin Surg Oncol* **21**, 23–29 (2003).
 66. Model, F. *et al.* Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. *Mol. Cancer Res.* **5**, 153–163 (2007).

67. Grützmann, R. *et al.* Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS ONE* **3**, e3759 (2008).
68. Devos, T. *et al.* Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin. Chem.* **55**, 1337–1346 (2009).
69. Warren, J. D. *et al.* Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med* **9**, 133 (2011).
70. Worthley, D. L. & Leggett, B. A. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* **31**, 31–38 (2010).
71. Moser, A. R. *et al.* ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur. J. Cancer* **31A**, 1061–1064 (1995).
72. Trosko, J. E., Taketo, M. M., Chang, C.-C., Upham, B. L. & Tai, M.-H. Mouse models of gastrointestinal tumors. *Cancer Sci.* **97**, 355–361 (2006).
73. Moser, A. R., Pitot, H. C. & Dove, W. F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322–324 (1990).
74. Su, L. K. *et al.* Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668–670 (1992).
75. Kucherlapati, M. H. *et al.* An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology* **138**, 993–1002.e1 (2010).
76. Haramis, A.-P. G. *et al.* De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**, 1684–1686 (2004).
77. Suzui, M. *et al.* Frequent mutations of the rat beta-catenin gene in colon cancers induced by methylazoxymethanol acetate plus 1-hydroxyanthraquinone. *Mol Carcinog* **24**, 232–237 (1999).
78. Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis* **21**, 1117–1120 (2000).
79. Gaspar, C. *et al.* Cross-species comparison of human and mouse intestinal polyps reveals conserved mechanisms in adenomatous polyposis coli (APC)-driven tumorigenesis. *Am J Pathol* **172**, 1363–1380 (2008).
80. Bennecke, M. *et al.* Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **18**, 135–146 (2010).
81. Leystra, A. A. *et al.* Mice Expressing Activated PI3K Develop Advanced Colon Cancer. *Cancer Res.* (2012). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4097
82. Takaku, K. *et al.* Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* **92**, 645–656 (1998).
83. Sansom, O. J. *et al.* Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14122–14127 (2006).
84. Schwitalla, S. *et al.* Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2012.12.012
85. Rad, R. *et al.* A Genetic Progression Model of Braf(V600E)-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention. *Cancer Cell* **24**, 15–29 (2013).
86. Golub, T. R. *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531–537 (1999).
87. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).

88. van t Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536 (2002).
89. Togo, N. *et al.* Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **14**, 4880–4888 (2008).
90. Arias, A. M. Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell* **105**, 425–431 (2001).
91. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 740–746 (2003).
92. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**, 265–273 (2009).
93. Tucker, R. P. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 173–177 (2003).
94. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142 (2006).
95. Nelson, C. M. & Bissell, M. J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 287–309 (2006).
96. Gossen, M., Bonin, A. L., Freundlieb, S. & Bujard, H. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 516–520 (1994).
97. Zambrowicz, B. P. *et al.* Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3789–3794 (1997).
98. Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J. & Elias, J. A. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 121–128 (2002).
99. Sauer, B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**, 381–392 (1998).
100. Pennimpede, T. *et al.* In vivo knockdown of Brachyury results in skeletal defects and urorectal malformations resembling caudal regression syndrome. *Dev. Biol.* **372**, 55–67 (2012).
101. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415 (2010).
102. Sato, T. *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762–1772 (2011).
103. Chaffer, C. L. *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 7950–7955 (2011).
104. Medema, J. P. & Vermeulen, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474**, 318 (2011).
105. Weber, M. *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* **37**, 853–862 (2005).
106. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
107. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49–54 (2002).
108. Hlubek, F. *et al.* Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *Int J Cancer* **121**, 1941–1948 (2007).

109. Snover, D. C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* **42**, 1–10 (2011).
110. Bustin, S. A. & Murphy, J. RNA biomarkers in colorectal cancer. *Methods* **59**, 116–125 (2013).
111. Lascorz, J., Chen, B., Hemminki, K. & Försti, A. Consensus pathways implicated in prognosis of colorectal cancer identified through systematic enrichment analysis of gene expression profiling studies. *PLoS ONE* **6**, e18867 (2011).
112. Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* **10**, e1001453 (2013).
113. De Sousa E Melo, F. *et al.* Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* **19**, 614–618 (2013).
114. Sadanandam, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* **19**, 619–625 (2013).
115. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* **59**, 110–118 (2013).
116. Müller, A. D. & Sonnenberg, A. Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans. *Ann. Intern. Med.* **123**, 904–910 (1995).
117. Mikeska, T., Bock, C., Do, H. & Dobrovic, A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **12**, 473–487 (2012).

VI. Erklärung nach §4 Absatz 3(k) der Habilitationsordnung

Hiermit erkläre ich, dass

- ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe,
- ich die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Assistenten, sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurde, und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, im November 2013

Dr. Markus Morkel