

Aus dem Institut für Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der Immunantwort gegen Kolontumoren im
Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-
Mausmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josephine Jung

aus Güstrow

Datum der Promotion: 08. Dezember 2017

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	01
SUMMARY	02
1. EINLEITUNG	03
1.1 Tumoren und Tumorentstehung	03
1.1.1 Epidemiologie von Darmtumoren: die „Cancer Clock“	05
1.2 Lgr5 als Stammzellmarker und SV40 Large T als Onkogen	07
1.2.1 Stammzellhypothese	07
1.2.2 Aufbau einer Krypte	08
1.2.3 Lgr5: Eigenschaften und Funktionen	10
1.2.4 SV40 Tag als Onkogen	10
1.3 Mausmodelle	13
1.3.1 Das Cre-/LoxP-Rekombinationssystem	13
1.3.2 Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag	14
1.3.3 Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag	14
2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	16
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Zelllinie 16.113	18
3.1.2 Medien und Puffer	18
3.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
3.1.4 Enzyme	23
3.1.5 Antikörper	23
3.1.6 Oligonukleotidprimer	25
3.1.7 Geräte	26
3.2 Mausstämme, -zucht und -typisierung	28
3.3 Methoden	29
3.3.1 <i>IN VITRO</i> -ANALYSEN UND ZELLKULTUR	29
3.3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen	29

3.3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	30
3.3.1.3	Anti-SV40 Large T-ELISA.....	30
3.3.1.4	Durchflusszytometrie.....	31
3.3.1.5	Isolierung von T-Lymphozyten und Splenozyten aus der Maus.....	32
3.3.2	<i>IN VIVO</i> -EXPERIMENTE.....	33
3.3.2.1	Blutabnahme und Analyse.....	33
3.3.2.2	Tamoxifen- und 4-Hydroxtamoxifenapplikation.....	33
3.3.2.3	Transplantationsexperimente mit der Tumorzelllinie 16.113.....	33
3.3.2.4	<i>In vivo</i> Kill-Assay.....	34
3.3.2.5	T-Zell-Depletion durch anti-Thy 1.2.....	35
3.3.2.6	Isolierung intestinaler Stammzellen.....	35
3.3.2.7	Gewinnung intraepithelialer Lymphozyten aus dem Darm.....	35
3.3.2.8	Analyse der Tumorentwicklung.....	36
3.3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	36
3.3.3.1	DNA-Amplifikation aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE)-Gewebe.....	36
3.3.3.2	Nachweis der Cre-/LoxP-Rekombination mittels PCR.....	37
3.3.4	HISTOCHEMIE.....	38
3.3.4.1	Präparation von Paraffinschnitten.....	38
3.3.4.2	CD3-Färbung.....	38
3.3.4.3	Tag-Färbung.....	39
3.3.5	STATISTISCHE ANALYSEN.....	39
4.	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Analyse der Immunantwort gegen Tumoren in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen ohne Tamoxifenapplikation.....	41
4.1.1	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter eine Toleranz der spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) gegen das dominante Epitop IV von Tag.....	41
4.1.2	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag- Mäuse produzieren IgG-Antikörper gegen Tag.....	41
4.1.3	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln Tag-positive Tumoren...	43

4.1.4	In den Tag-exprimierenden Tumoren hat Cre-/LoxP-Rekombination stattgefunden.....	45
4.2	Analyse der Immunantwort gegen Tumoren in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen nach Tamoxifengabe.....	46
4.2.1	Zwei bis vier Monate nach Tamoxifenapplikation entwickeln Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse eine dichotome ZTL-Toleranz gegen Peptid IV.....	46
4.2.2	Sowohl Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag- als auch Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln hohe anti-Tag-spezifische IgG-Titer.....	49
4.2.3	Präsumptiv geringere Rekombinationsfrequenz in Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen als in Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen unter Nutzung der Rosa26-RFP-Reportermaus.....	51
4.2.4	Verzögerte Tumorentwicklung und damit einhergehend längeres Überleben in Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen im Vergleich zu Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen.....	53
4.2.5	Eliminierung der Tag-positiven Zellen durch reaktive CD8 ⁺ T-Zellen nach Tamoxifengabe in Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen.....	56
5.	DISKUSSION.....	61
5.1	Neue Erkenntnisse aus diesen Tumormodellen.....	61
5.1.1	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifengabe entwickeln selten mikroskopisch Tag-positive Darmläsionen oder Darmtumoren...	61
5.1.2	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifenapplikation zeigen eine vergleichbare Toleranzentwicklung im CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Kompartiment.....	62
5.1.3	Die Tamoxifenapplikation führt bei Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen zu einer erhöhten Tumorinzidenz im Vergleich zur nicht induzierten Tag-Expression.....	63
5.1.4	Nachweis einer effizienteren Rekombinationsfrequenz in Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen im Vergleich zur Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Maus mit Hilfe der Rosa26-RFP-Indikatormaus.....	64

5.1.5	Unabhängig von der Induktion der Tag-Expression durch Tamoxifen zeigen Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse eine längere Latenz der Tumorentwicklung als Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse.....	65
5.1.6	T-Zell-Aktivierung im Darm als mögliche Ursache für die längere Latenz der Tumorigenese.....	65
5.2	Limitationen der verwendeten Mausmodelle.....	66
5.2.1	LoxP-Tag-Maus.....	66
5.2.2	Cre-Rekombinase.....	66
5.2.3	Lgr5-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag.....	67
5.2.4	Villin-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag.....	67
5.3	Anwendung beim Menschen.....	68
5.4	Fazit zu den Tumormodellen und Ausblick.....	69
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
	ABKÜRZUNGS- UND AKRONYMVERZEICHNIS.....	84
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	88
	DANKSAGUNG.....	89
	CURRICULUM VITAE.....	90

ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom (CRC) stellt immer noch eine der häufigsten Todesursachen von Krebs beim Menschen dar.

Um die sporadische Entstehung des CRC im Menschen zu imitieren haben wir neue Mausmodelle generiert, welche durch gerichtete Stammzelltransformation durch das SV40 T-Antigen (Tag) in der putativen Stammzellregion der intestinalen Krypten spontan Tumore entwickeln.

Mit Hilfe der Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus haben wir die Immunantwort gegen spontan entstehende Tumoren des gastrointestinalen Traktes analysiert und einander gegenübergestellt. Diese sind entweder durch Applikation von niedrig dosiertem Tamoxifen oder durch eine Tamoxifen-unabhängige stochastische Tag-Expression entstanden.

Weiterhin haben wir die Induktion anti-Tag-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten und IgG in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen analysieren.

Dabei fanden wir heraus, dass sowohl junge als auch einige wenige ältere Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgene Mäuse noch eine signifikante zytotoxische T-Zellantwort gegen das dominante Epitop IV von Tag aufrecht behielten. Des Weiteren zeigten diese Mäuse einen mit zunehmendem Alter ansteigenden anti-Tag spezifischen IgG-Titer.

Im Vergleich zu Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen, welche Tag auch außerhalb der Stammzelle in den Mikrovilli des epithelialen Bürstensaumes im gastrointestinalen Trakt exprimieren (Czéh et al., 2010, Oncogene, 29: 6591), führt die spatio-temporale Tamoxifen-induzierbare Tag-Expression in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen zu einer längeren Tumortalenz und somit Überlebenszeit. In dem letzteren Modell entwickeln die Mäuse gastrointestinale Tumoren zum Beispiel im Darm, Magen, Pankreas und in der Leber.

Die Tamoxifengabe kann eine signifikante ZTL-Antwort in diesen Mäusen hervorrufen und führt zu der Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Darm, die mit Hilfe der Marker CD44 und CD69 nachgewiesen werden konnte.

Die beschriebenen Tumormodelle ermöglichen ein besseres Verständnis sowohl der lokalen als auch systemischen Immunantwort während des langen Prozesses der Tumorentstehung und erlauben es uns neue Therapeutika zu testen.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is still one of the most common causes of death from cancer in humans.

In order to mimic the sporadic nature of human colon carcinoma development we generated novel mouse models with spontaneous tumour growth by directing the expression of SV40 T antigen (Tag) into the putative stem cell region of the intestinal crypts.

With the help of Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgenic mice we analyzed and compared the anti-tumour immune response against colorectal cancer directed towards spontaneously arising tumours either throughout the activation of the Cre-recombinase by low-dose Tamoxifen administration or via a stochastic Tag expression in a Tamoxifen-independent fashion.

We furthermore aimed to analyze the induction of CTL tolerance towards Tag in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgenic mice at different ages and to follow their anti-Tag IgG antibody response.

We found in the stochastic model that young as well as some of the aged Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgenic mice still retained CTL responses against the dominant epitope IV of Tag. Furthermore these mice showed an increasing anti-Tag IgG response with age.

When comparing Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag mice to the Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgenic mice which express Tag in the microvilli of the brush border epithelial cells lining the gut (Czéh et al., 2010, Oncogene, 29: 6591) in the sporadic Tamoxifen-induced tumour model we found that Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag mice live significantly longer and start to develop tumours at a later time point. In this model Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag mice develop tumours in the gastrointestinal tract such as stomach cancer, pancreatic cancer, cancer of the intestine and liver cancer. The administration of Tamoxifen is able to induce a significant CTL response in these mice and leads to the activation of T cells in the intestine identified by the markers CD69 and CD44.

The described colon tumour models offer the opportunity for a better understanding of local as well as systemic immune responses throughout the long process of tumorigenesis and allow testing of novel therapeutics.

1. EINLEITUNG

1.1 Tumoren und Tumorentstehung

Ein Tumor (lateinisch, „Geschwulst“ oder „Wucherung“) im medizinischen Sinne steht für eine Raumforderung unklarer Dignität. Im allgemeinsprachlichen Gebrauch dagegen wird vom Tumor als eine maligne Entartung eines bestimmten Gewebes oder eines Organs gesprochen. Die genauen Mechanismen der Entstehung von bösartigen Tumoren waren lange Zeit unbekannt.

Schon Hippokrates von Kos (um 460 v. Chr. - um 370 v. Chr.) beschrieb verschiedene Tumorarten und benannte sie mit dem griechischen Wort *carcinosis*, gleichbedeutend mit dem Wort „Krebs“ im Deutschen [1].

Im modernen Zeitalter postulierte Rudolf Virchow in den 1850er Jahren, dass Krankheiten auf Störungen von Körperzellen basieren (die sog. Theorie der Zellulärpathologie) und David von Hansemanns „Prinzipiosigkeit als Prinzip der Krebszellen“ beschrieb 1890 das gemeinsame Auftreten von Chromosomenabnormalitäten und genetischer Instabilität bei Tumoren [2-3] als Basis für die Krebsentstehung.

Paul Ehrlich ergänzte 1909 ein weiteres Puzzlestück: das Immunsystem. Er setzte voraus, dass die Tumorentstehung für gewöhnlich durch das Immunsystem supprimiert würde [4]. Welche Rolle es dabei genau einnimmt ist bis heute das zentrale Thema der Debatte in dem Forschungsgebiet der Tumorummunologie und bildet letzten Endes die Grundlage für den Ansatz der Immuntherapie als therapeutische Ergänzung zur derzeitigen Krebstherapie. Die Arbeitsgruppe von Thomas Wölfel in Mainz konnte 1995 erstmals beim Menschen zeigen, dass ein Tumor-spezifisches Antigen von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird und eine detektierbare Immunantwort auslöst [5].

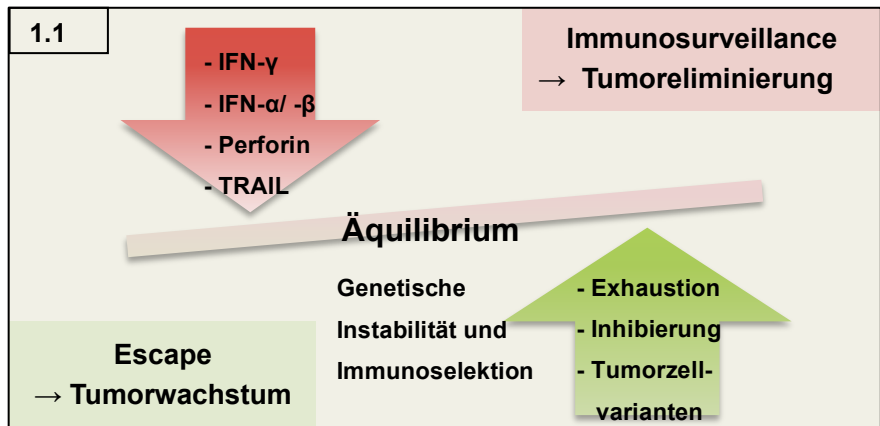
In der Grundlagenforschung spalten sich die Lager (Abbildung 1.1).

Robert Schreiber und seine Arbeitsgruppe zeigten 2001, dass immundefiziente Mäuse eher sowohl chemisch-induzierte als auch spontane Tumoren entwickeln [6] und prägten somit den Begriff der „Immunosurveillance“ neu. Das Erkennen und Überwachen der Tumorzellen durch das Immunsystem führt in immunkompetenten Mäusen zu folgendem Dilemma: es entsteht ein Selektionsdruck (das sogenannte

„Immunoediting“), der zu reduzierter Immunogenität und schließlich zum Auswachsen des Tumors (dem sog. „Immunescape“) führt.

Gerald Willimsky und Thomas Blankenstein konnten 2005 hingegen zeigen, dass in immunkompetenten Mäusen bei der Entstehung sporadischer Tumore nicht die Immunogenität abnimmt, sondern Toleranz induziert wird, um einer spezifischen Immunantwort zu entweichen [7-9].

Abbildung 1.1: adaptiert von Dunn GP, Koebel CM and Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat. Rev. Immunology Vol 6: 836-848 (2006). Der Prozess des „Immunoediting“ wird in drei Phasen unterteilt: Elimination, Äqui-



librium und Escape. In der ersten Phase, der Eliminationsphase, werden die transformierten Zellen durch das angeborene und adaptive Immunsystem erkannt. Es werden Chemokine und Zytokine produziert, welche das Abtöten der Tumorzellen ermöglichen. Falls einige Tumorzellen diesem Prozess entkommen, beginnt die zweite Phase: das Äquilibrium. In dieser Phase persistiert der Tumor, aber unterliegt dennoch dem Druck des Immunsystems. Die dritte Phase beginnt, wenn das Gleichgewicht zwischen der Immunantwort und dem Tumor aufgrund von einer Erschöpfung („Exhaustion“) des Immunsystems kippt oder dem Auftreten von Tumorzellvarianten, die es dem Tumor ermöglichen dem Immunsystem zu entkommen.

Wie diese Hypothesen und Erkenntnisse aus dem tierexperimentellen Forschungsbereich tatsächlich in den Zusammenhang mit dem humanen System gesetzt werden müssen bleibt noch offen. Eins ist jedoch klar: genauso wie die Evolution im Tierreich durch Mutation und Selektion bestimmt wird, ebenso ist die Krebsentwicklung sowohl durch Onkogenmutation als auch Alterationen im Selektionsdruck bedingt. Begünstigende Faktoren sind Alterung und/oder Karzinogenexposition [10]. Jesse M. Zaretsky zeigte 2016 am Beispiel des Malignen Melanoms, dass nur unter Immuntherapie mit PD-1-Inhibition klonale Selektion entsteht, resistente Tumore auswachsen und folglich dieses T-Zell-vermittelt sein muss [11].

Weiterhin zeigte Laura M. Rogers bereits im Jahre 2013 im Sleeping Beauty (SB)-Mausmodell, dass B- und T-Zellen eine formende Funktion bezüglich des genetischen

Profils von Tumoren verschiedenster Art besitzen, jedoch nicht in der Lage sind SB-induzierte Tumore zu eliminieren [12].

Krebs gehört als Erkrankung des Alters heute weltweit zu einer der häufigsten Todesursachen mit einer Inzidenz von 14,1 Millionen und einer Mortalität von 8,2 Millionen Menschen allein im Jahr 2012 – Tendenz steigend [13] – und stellt somit einen der wichtigsten Bereiche der Forschung dar.

Im folgenden Abschnitt sollen die zeitgenössischen Hypothesen zur Entstehung von Darmtumoren, sowie die Diagnostik und Differenzialdiagnostik, Therapie und Prognose von Darmkrebs erörtert werden.

1.1.1 Epidemiologie von Darmtumoren: die „Cancer Clock“ (Adenom-Karzinom-Sequenz)

Das Kolorektale Karzinom (CRC) zählt zu den führenden malignen Erkrankungen in Europa und Nordamerika [14-15] mit der drittgrößten Mortalität unter allen Tumorentitäten in der westlichen Zivilisation.

Neben der familiären, genetischen Form des CRC, wie beispielsweise das Hereditäre nicht-polypomatöse kolorektale Karzinom (HNPCC) oder die Familiäre Adenomatosis Polyposis (FAP), welche durch eine vererbte Mutation des APC-Gens entstehen [16], ist das sporadische Auftreten die beim Menschen am häufigsten verbreitete Form des CRC [17-20].

Die Tumorigenese erfolgt durch stufenweises Akkumulieren verschiedener Mutationen – dieses wird auch als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet.

Als erster Schritt in der Kaskade genetischer Alterationen wurde die bi-allelische Inaktivierung des APC-Gens identifiziert. Während beim sporadischen CRC die APC-Mutation dem klassischen „Two-Hit-Modell“ der Tumorsuppressor-Inaktivierung von Knudson folgt (das heißt es finden zwei erworbene somatische Mutationen statt), wird bei der FAP ein defektes Allel bereits über die Keimbahn autosomal dominant vererbt. Der Verlust des APC-Genproduktes führt zu einer ineffizienten Degradation des Transkriptionsfaktors β -Catenin, welche zu einer gesteigerten Transkription von Zielgenen (wie beispielsweise c-myc, Zyklin D, etc.) führt und über diesen Weg einerseits indirekt Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, Zellproliferation und Apoptose-Inhibition nimmt und andererseits direkt durch seine Beteiligung an der regelrechten Ausbildung des mitotischen Spindelapparates eine chromosomale Instabilität

verursacht. Dieser Überlebensvorteil der Zellen ermöglicht die klonale Expansion, weshalb dem APC-Gen auch eine Gatekeeper-Funktion zugeschrieben wird (Abbildung 1.2 a).

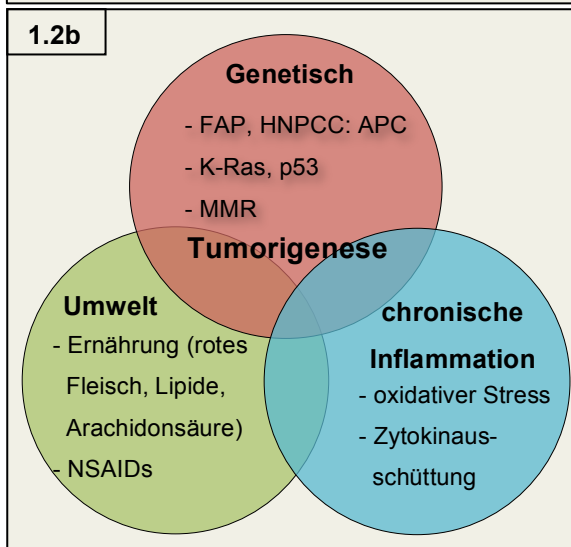
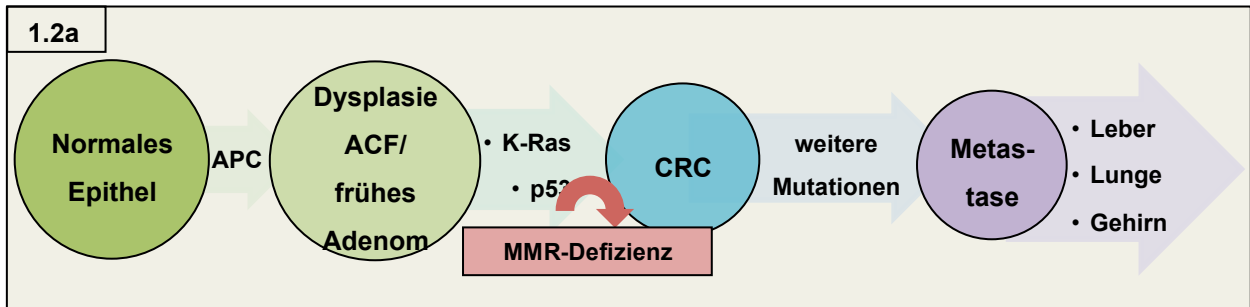


Abbildung 1.2 a: adaptiert von Kinzler WK & Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. Cell Vol. 87: 159-170 (1996).

Das APC-Gen besitzt eine Torhüter („Gatekeeper“-) Funktion. In bis zu 80 Prozent aller kolorektalen Adenome ist das APC-Gen bi-allelisch mutiert [21] und es sind mindestens fünf genetische Alterationen für die Karzinomentstehung notwendig, weniger für eine benigne Tumorigenese. Menschen mit FAP erben APC-Mutationen und entwickeln multiple dysplastische aberrante Krypten (ACF). Einige von ihnen entwickeln sich durch eine Akkumulation der

dargestellten Mutationen weiter. Eine MMR-Defizienz beschleunigt diesen Prozess. K-Ras ist ein Onkogen welches für seine Aktivierung nur ein genetisches Ereignis benötigt. P53 ist ein Tumorsuppressor, der zwei genetische „Hits“ (jeweils einen pro Allel) für seine Inaktivierung benötigt. Eine Vielzahl anderer genetischer Alterationen wurde in einem kleinen Teil fortgeschrittener kolorektaler Karzinome (CRC) beschrieben, die eventuell für den unterschiedlichen Phänotyp verantwortlich sein mögen.

Abbildung 1.2 b: Umweltfaktoren wie eine lipidreiche Ernährung oder Rauchen können die Entstehung des CRC fördern. Der Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wurde ein protektiver Effekt zugeschrieben. Eine chronische Inflammation kann durch oxidativen Stress und Zytokinsturm zur Tumorentstehung führen. Beispielsweise haben Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ein vielfach höheres Risiko Darmtumore zu entwickeln. Genetische Faktoren spielen vor allem bei der Polyposis coli und dem Lynch-Syndrom eine essentielle Rolle.

In der zweiten, intermediären Phase wird das K-Ras-Onkogen aktivierend mutiert, was zu genetischen Alterationen auf dem langen Arm von Chromosom 18 führt. Histomorphologisch zeigt sich auf dieser Stufe eine low-grade intraepitheliale Dysplasie. Der Übergang zur high-grade intraepithelialen Dysplasie (bzw. zum Karzinom) wird

durch die Mutation des p53-Tumorsuppressor-Gens auf Chromosom 17p eingeleitet [22]. Beim Lynch-Syndrom liegt eine Mutation im MMR-System (DNA-Mismatch-Reparaturgen) vor, welche zu einer exponentiell beschleunigten Anhäufung von Replikationsfehlern bei der Zellteilung führt. Dabei liegt häufig eine Mutation von Genen mit repetitiven Sequenzen wie TGF- β -Rezeptor II oder BAX vor.

Außerdem ist die Darmtumorentstehung multifaktoriell bedingt und wird durch Umweltfaktoren wie die Ernährung (tierische Fette, rotes Fleisch, Arachidonsäure) und durch chemische Reizung wie sie beispielsweise bei chronischer Inflammation (oxidativer Stress, Zytokinausschüttung) auftritt oder durch die chemopräventive Einnahme nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) beeinflusst (Abbildung 1.2 b).

1.2 Lgr5 als Stammzellmarker und SV40 Large T als Onkogen

In diesem Abschnitt werden die Stammzellhypothese, der Aufbau der Krypten anhand des murinen Modells, der Stammzellmarker Lgr5 und das SV40-Large T-Antigen vorgestellt.

1.2.1 Stammzellhypothese

Im Jahr 1937 zeigten Jacob Furth und Morton Kahn, dass eine einzelne leukämische Zelle die systemische Krankheit nach Transfer in eine Maus verursachen kann [23]. Sie initiierten somit die Hypothese der Tumorentstehung aus einer Krebsstammzelle. Allerdings dauerte es knapp weitere sechzig Jahre bis diese Tumor-initiiierenden Zellen näher identifiziert und charakterisiert wurden. Obwohl die Stammzellhypothese initial im hämatopoetischen Modell beschrieben [24-28] wurde, ließ sie sich später auch auf solide Tumoren [29-30] erweitern.

Das Darmepithel ist eines der am meisten proliferierenden Gewebe beim Menschen [31-32] – der tägliche Zellumsatz ist enorm und innerhalb von drei bis fünf Tagen [33] findet in der Maus, in sechs bis acht Tagen beim Menschen eine vollständige Erneuerung des Epithels statt [34]. In Bezug auf die Entstehung von Darmtumoren wird postuliert, dass das CRC aus den Stammzellen, welche an der Basis der Krypte verankert sind, entsteht und diese dort während des hohen Epithelumsatzes zahlreiche Mutationen erwerben [35]. Sie stellen die einzigen Zellen in stark proliferierenden Geweben wie dem Darm dar, die lange genug leben um die sukzessiven Mutationen zu

erwerben [36]. Die Frage, ob solide Tumoren aus erworbenen Mutationen in normalen Gewebstammzellen hervorgehen oder Stammzell-ähnliche Eigenschaften in weiter differenzierten Zellen erworben werden, muss noch abschließend geklärt werden [37].

1.2.2 Aufbau einer Krypte

Der menschliche Darm ist seiner Funktion optimal angepasst – im Dünndarm wird die Nahrung enzymatisch gespalten und über die Mikrovilli werden zahlreiche Nährstoffe resorbiert; die Aufgabe des dicht mit Bakterien besiedelten Dickdarms ist die Wasserrückresorption und dadurch die Eindickung der Faeces.

Der Dünndarm ist von einem hochprismatischen, einschichtigen Zylinderepithel ausgekleidet und gliedert sich in Lieberkühn-Krypten und Villi (Dünndarmzotten) [38], wodurch sich die Resorptionsoberfläche um ein Vielfaches vergrößert, das Dickdarmepithel dagegen ist frei von Villi.

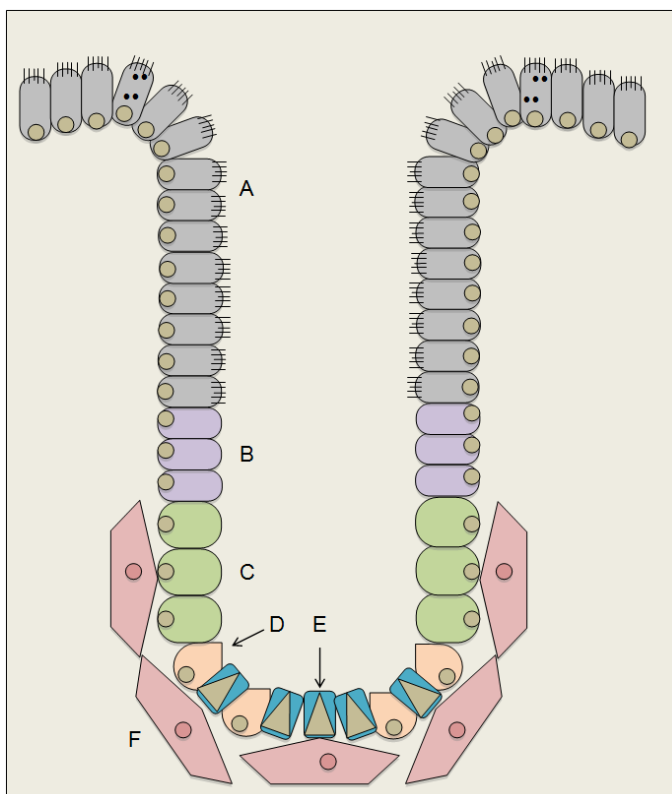


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung einer Krypte im Dünndarm (von unten nach oben). An der Basis der Krypte befinden sich die Paneth-Zellen (D) und die Lgr5-positiven Stammzellen (E). Sie bilden gemeinsam die Columnar Base Cells (CBCs). Umliegend sitzen mesenchymale Myofibroblasten (F), die Wnt-Signal-Liganden produzieren. Weiter aufsteigend formieren sich zunächst die Transit Amplifying- (C) und dann die Progenitor-Zellen (B). Die ausdifferenzierten Zellen (A) sitzen oben und setzen sich aus enteroendokrinen Zellen, Goblet-Zellen (auch Muzin-produzierende Becherzellen genannt) und Enterozyten zusammen.

In der Maus sind an der Basis der Krypte vier bis sechs Stammzellen [39], zwischen den Paneth-Zellen im Dünndarm und den Mukus-sezernierenden Goblet-Zellen im Dickdarm, an Position '+4' lokalisiert [40]. Diese Stammzellen exprimieren den Marker Lgr5 (leucine-rich-repeat-containing G-protein coupled receptor 5, oder Gpr49) und sind

schmal geformt (siehe Abbildung 1.3). Sie weisen einen keilförmigen Zellkern auf, welcher von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist. Aufgrund ihrer Lokalisation werden sie auch als „Columnar Base Cells“ (CBC) bezeichnet [41-42].

Lgr5-positive Stammzellen sind gewebsspezifisch, regenerationsfähig („self-renewal“) und multipotent, das heißt sie können sich zu allen Zelltypen des Darmepithels ausdifferenzieren. Sie werden als langlebig bezeichnet und sind mit einer Teilung pro Tag recht teilungsaktiv [32].

Direkt über den Stammzellen, an der Krypten-Villus-Grenze, befinden sich die „Transit Amplifying“ (TA)-Zellen. Diese teilen sich alle 12 bis 16 Stunden und generieren somit täglich bis zu 300 neue Zellen pro Krypte [43]. Während ihrer Differenzierung wandern sie entlang der Krypten-Villus-Achse weiter nach oben bis sie nach circa 48 Stunden und insgesamt bis zu fünf Teilungen die Krypten-Villus-Grenze erreichen [43]. Sobald die TA-Zellen an dieser Grenze angekommen sind, differenzieren sie sich sehr schnell während sie stetig weiter nach oben migrieren. Dabei konstituieren TA-Zellen im Dünndarm drei verschiedene Zelltypen: die Enterozyten, Goblet-Zellen und die Peptidhormon-sekretierenden enteroendokrinen Zellen. Im Dickdarm läuft der Differenzierungsprozess ähnlich ab, mit der Ausnahme, dass sich die TA-Zellen dort zu Kolonozyten und Goblet-Zellen entwickeln. Die einzigen Zellen, welche diesem Kreislauf entweichen sind die Paneth-Zellen. Sie verweilen für drei bis sechs Wochen an der Kryptenbasis [44-46] bis sie in Apoptose gehen.

Die perikryptalen Myofibroblasten, die aus der mesenchymalen Linie hervorgehen, produzieren Wnt-Signal-Liganden und stimulieren somit nicht nur die Aufrechterhaltung des Stammzellverhaltens, sondern auch die Zellmigration und -differenzierung [47-49].

Eine genetisch alterierte Stammzelle kann die gesamte Stammzellnische besetzen, entweder durch genetischen Drift oder durch das Akquirieren eines Selektionsvorteils (auch als „Nischensukzession“ bezeichnet) [21]. Intestinale Krypten sind klonale Populationen, Adenome sind polyklonal. Dies ist wahrscheinlich durch Interaktionen zwischen den verschiedenen Tumor-initiierten Klonen bedingt. Eine Erklärung dafür liefert zum einen die „Top-down-Hypothese“: dysplastische Zellen durchwachsen die benachbarten Krypten invasiv [50]. Zum anderen existiert die „Bottom-up-Hypothese“: die besagt, dass sich mutierte Krypten durch Fission teilen und über den Weg der Gebietskanzeration zur Mutationsausbreitung über das komplette Darmepithel führen [51-52].

1.2.3 Lgr5: Eigenschaften und Funktionen

Die epitheliale Homöostase im Darm des Erwachsenen wird durch verschiedene Signalkaskaden gewährleistet. Die wichtigsten sind dabei der Wnt- [53], Notch-, BMP- (knochenmorphogenetisches Protein) und Hedgehog-Signalweg [54].

Das Gen *Lgr5* kodiert einen seltenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der durch eine Leucin-reiche extrazelluläre Domäne gekennzeichnet ist [55]. Es wurde als ein Wnt-Zielgen für das humane CRC [56], das Ovarialzellkarzinom und hepatozelluläre Karzinom beschrieben [57-58].

Seine verwandten Gene *Lgr4* und *Lgr6* kodieren ebenso für sieben-Transmembran-Rezeptoren, welche sich evolutionsbedingt gemeinsam mit den Glykoprotein-Hormonrezeptoren für FSH, LH und TSH entwickelt haben [55, 59-60].

Lgr4 und *Lgr5* assoziieren mit dem Frizzled/Lrp-Wnt-Rezeptorkomplex und alle *Lgr5*-Homologe sind fakultative Wnt-Rezeptorkomponenten, welche das Wnt-Signal über lösliche R-Spondine verstärken können [61].

Der Marker *Lgr5* kennzeichnet proliferierende Stammzellen in verschiedenen Kompartimenten zu denen unter anderem der Dünn- und Dickdarm [32], der Magen [62] und die Haarfollikel [63] gehören.

Lgr6 ist ein Marker für multipotente Stammzellen der Talgdrüsen und der Epidermis [64-65]. Obwohl die Expression von *Lgr4* sehr weitläufig ist [66], wird *Lgr5* in den oben genannten Kompartimenten oft zusammen mit *Lgr4* ko-exprimiert [67-68].

Da eine genetische Deletion von *Lgr5* oder *Lgr4* in Mäusen neonatal-letal ist, deutet dies auf seine wichtigen Funktionen während der Embryogenese hin [66,69].

Erst kürzlich wurde daher die Expression von *Lgr5* als Stammzellmarker auf weitere Organe und Epithelia erweitert. Dazu gehören unter anderem eine Expression während der Nierenontogenese [70], *Lgr5* als Marker für ovarielles und tubuläres Epithel [71-72], die Expression in Stammzellen des Corneaepithels [73] und bei der Regeneration von Pankreas- und Leberepithel [74-75].

1.2.4 SV40 Tag als Onkogen

Beim „Simian Virus“ (SV) 40 handelt es sich um einen Polyomavirus, der 1960 von Sweet und Hilleman [76] isoliert wurde. Es scheint, als wurde er durch kontaminierte

Poliovakzine, die früher aus primärer Zellkultur von Nierenzellen des häufig mit SV40 infizierten Rhesusaffen gewonnen wurden, in die menschliche Population eingeführt.

Das SV40-Genom ist in seiner Struktur ähnlich dem Genom anderer Polyomaviren wie beispielsweise dem Humanen Polyomavirus 1 (BK-Virus) und 2 (JC-Virus). Das heißt, es enthält neben seinen kodierenden auch zahlreiche regulatorische Regionen. Die für Proteine kodierenden DNA-Regionen sind verschlüsselt für regulatorische (small t- und Large T-Antigen, Agnoprotein) und strukturelle Kapsidproteine (VP-1 bis -3). Die regulatorische Region von SV40 enthält den Ursprung der DNA-Replikation und Promoter-/bzw. Verstärkerelemente als Zielstruktur für Transkriptionsfaktoren [77]. Im Jahre 2008 konnte ein Polyomavirus als ätiologisch für die Entstehung des Merkelzellkarzinoms identifiziert werden [78].

Im Anschluss an seine Entdeckung wurde SV40 in einer Reihe von Tiermodellen für die Virus-vermittelte Tumorinduktion getestet [79-81]. Es stellte sich heraus, dass nicht alle Zellen empfänglich für eine Infektion mit SV40 sind - Affen gelten als vulnerabel, Mauszellen werden als nicht-permissiv eingestuft und humane Zellen als semipermissiv bezeichnet. Die Frage, ob SV40 humane Zellen infizieren [82] und letztlich Tumoren beim Menschen induzieren kann [83], ist noch nicht abschließend geklärt. Mit der Hilfe von der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der DNA-Hybridisierung/-Sequenzierung und Immunofluoreszenz konnte das SV40-Genom und die Tag-Expression in Mesotheliomen [84-89], Hirntumoren [90-94], Osteosarkomen und in Tumoren beim immunsupprimierten Patienten [87; 95-98] nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass in nicht-vulnerablen Zellen das virale Genom ungerichtet in das Wirtsgenom integriert [99] und daraus die Transformation auf zellulärer Ebene resultiert. Die viralen Onkogene des SV40 werden dabei kontinuierlich exprimiert, um die Zellen gegebenenfalls in einem transformierten Zustand zu erhalten. Der exakte Mechanismus der Transformation und Unsterblichkeitsinduktion ist noch unbekannt, obwohl das virale Onkogen Tag in allererster Linie auf Schlüsselzellzyklusregulatoren und Tumorsuppressoren abzielt. Sie werden somit in ihrer Funktion inaktiviert und die Zellzyklusproliferation wird dereguliert.

Um maligne humane Erkrankungen in einem transgenen murinen Tumormodell widerzuspiegeln kann sich die Expression des SV40-Onkogens zu Nutzen gemacht werden, wenn es unter der Kontrolle eines Gewebe-spezifischen Promoters liegt. Das SV40 „Large T antigen“ (SV40 Tag) ist ein transformierendes Protein, das die Proliferationskontrolle in der G₁-Phase des Zellzyklus aufhebt indem es gleichzeitig das

Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (pRb) und das Apoptose-induzierende p53 inaktiviert [100-101].

Einerseits fällt durch die Bindung von Tag an pRb die Suppression der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie weg und es werden vermehrt Proliferations-fördernde Gene exprimiert. Andererseits werden durch die Inaktivierung von p53 bestimmte Gene ausgeschaltet, die für Apoptose-induzierende Proteine kodieren. Dadurch können ruhende Zellen zurück in die S-Phase des Zellzyklus und somit dem programmierten Zelltod entkommen.

Das multifunktionale SV40 Tag-Onkoprotein besitzt mehrere funktionale Domänen, die eine wichtige Rolle bei der Zelltransformation und Tumorinduktion spielen [102]. In der Abbildung 1.4 werden die verschiedenen funktionellen Domänen von SV40 Tag schematisch dargestellt. An dem N-terminalen Aminosäurende befindet sich die J-Domäne, welche essentiell für die Faltung von Proteinkomplexen ist. Diese Region teilt 82 Aminosäuren mit dem small t-Antigen, das durch alternatives Splicing entsteht. Über das C-terminale Aminosäurende wird die Bindung von Tag an pRb und seine Familienmitglieder p107 und p130 vermittelt [103-104].

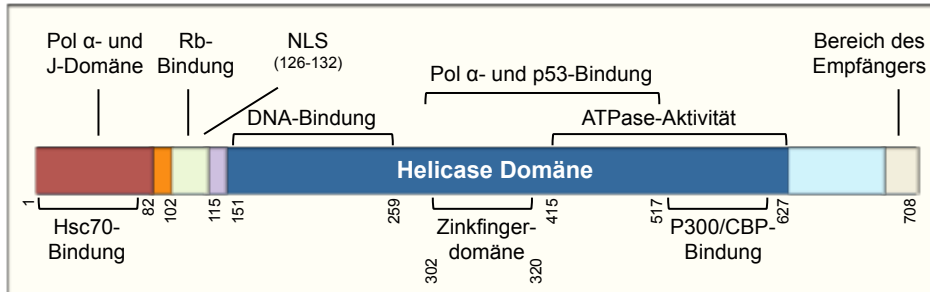


Abbildung 1.4: Aufbau und Struktur des SV40 Tag, adaptiert von Sariyer IK et al. Tumor induction by simian and human polyoma viruses.

Cancer Therapy, Vol 2: 85-98 (2004). Es sind die Regionen des Tag abgebildet, welche Polymerase α -Primase ($\text{Pol}\alpha$), die Tumorsuppressorproteine pRB und p53, das humane Hitzeschockprotein 70 (hsc70) und die Koaktivatoren p300 und CBP binden. Ebenso sind die DNA Bindungsdomäne, die ATPase-Aktivitätsdomäne, Nukleäres Lokalisierungssignal (NLS)-Domäne, Helikasedomäne, Empfangsdomäne, Zinkfingerdomäne und J-Domäne dargestellt.

1.3 Mausmodelle

In dem folgenden Abschnitt werden die für diese Arbeit verwendeten Mausmodelle vorgestellt.

1.3.1 Das Cre-/LoxP-Rekombinationssystem in der LoxP-Tag-Maus

Die Tag-Expression wurde Gewebe-spezifisch unter der Nutzung des Cre-/LoxP-Rekombinationssystems induziert [105-106].

Die LoxP-Tag transgene Maus exprimiert Tag unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG-Promoters [7].

Eine CAT-Stoppkassette, die von zwei jeweils 34 Basenpaaren langen LoxP-Erkennungssequenzen begrenzt ist, verhindert unter normalen Bedingungen die Rekombination durch das Cre-Protein und somit die Tag-Expression.

Nach Aktivierung der Cre-Rekombinase, wandert diese in den Zellkern, schneidet die Stoppkassette aus und führt zur Expression von Tag (siehe Abbildung 1.5). Auf molekularer Ebene bedeutet das, dass jedes einzelne Rekombinasemolekül eine palindromische Hälfte der LoxP-Erkennungssequenz bindet und durch die Bildung eines Tetramers beide LoxP-Sequenzen zusammengebracht werden [107].

Unabhängig davon entwickelt die LoxP-Tag-Maus nach langer Latenz spontane Tumoren in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel in Niere, Leber, Hoden, Bindegewebe, Milz und Thymus [7].

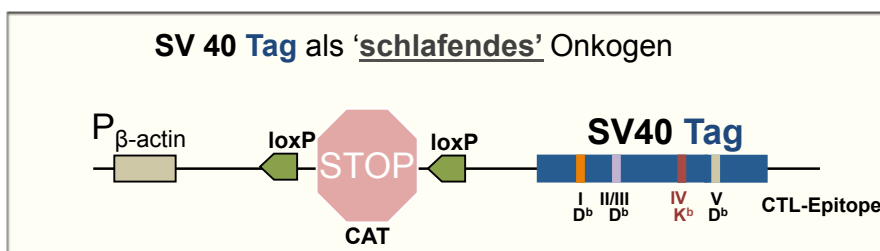


Abbildung 1.5: DNA-Konstrukt des SV40-Tag. Tag liegt unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten CAG Promoters. Die CAT-Stoppkassette ist von zwei

LoxP-Erkennungssequenzen umgeben, sodass Tag unter normalen Bedingungen nicht exprimiert wird. Erst durch eine Aktivierung der Cre-Rekombinase wird die Stoppkassette ausgeschnitten und das SV40-T-Antigen aktiviert.

1.3.2 Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag

Es wurden für die vorliegende Arbeit zwei transgene Mausstämme verwendet (siehe Abbildung 1.6).

In dem ersten transgenen Mausmodell, der Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus, unterliegt die Cre-Rekombinase der Kontrolle der Villin-9kb regulatorischen Region, die in der putativen Stammzellregion der Lieberkühn-Krypten aktiv [108-109] ist.

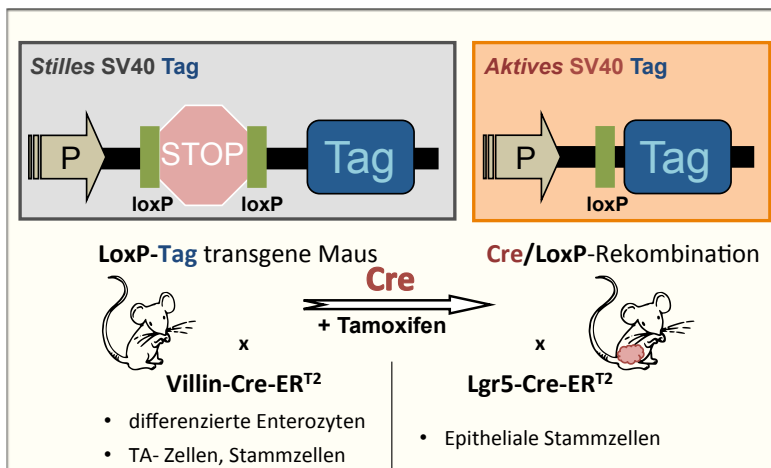


Abbildung 1.6: Einführung der transgenen Mausstämme Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag.

In der Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus ist die Cre-Rekombinase in allen Zellen des Darmes aktiv, das heißt sowohl in den Stammzellen als auch in Transit Amplifying- und ausdifferenzierten Zellen. In der Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus

dagegen findet die Cre-LoxP-Rekombination nur in den epithelialen Stammzellen statt, welche den Marker Lgr5 exprimieren. In beiden Mausmodellen wird die Cre-Rekombinase durch die Applikation von Tamoxifen aktiviert.

In dem ersten transgenen Mausmodell, der Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus, unterliegt die Cre-Rekombinase der Kontrolle der Villin-9kb regulatorischen Region, die in der putativen Stammzellregion der Lieberkühn-Krypten aktiv [108-109] ist.

Durch die Gabe von Tamoxifen [110] wird in diesem Modell die Cre-Rekombinase in den Kern transloziert, da sie mit einer mutierten Form des humanen Östrogenrezeptors, dem ER^{T2}-Rezeptor [111], fusioniert ist. Es erfolgt die Expression von Tag in allen Zellen der Krypten-Villus-Achse, folglich abgesehen von den differenzierten Enterozyten auch in den undifferenzierten Stamm- und TA-Zellen des gastrointestinalen Traktes.

1.3.3 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag

In einem zweiten Mausstamm, der Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus, wird die Expression der Cre-Rekombinase durch den Lgr5-Promoter reguliert (siehe Abbildung

1.7). Das erste Exon des Lgr5-Gens ist durch ein genetisches 'knock-in' via interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) an das grüne Fluoreszenzprotein eGFP gekoppelt. Somit wird durch Tamoxifenapplikation die Tag-Expression spezifisch in den grün leuchtenden Stammzellen der Krypten aktiviert [32].

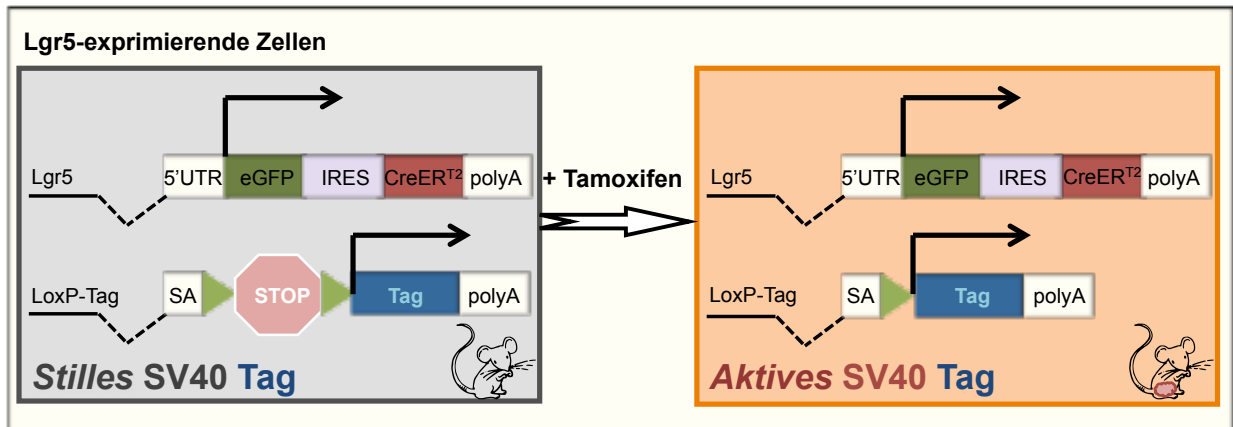


Abbildung 1.7: Aufbau des DNA-Konstrukts in Lgr5-Cre-ERT2 x LoxP-Tag-Mäusen.

Lgr5 ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) an das grüne Fluoreszenzprotein eGFP gekoppelt. Nach Tamoxifenapplikation wird nach Herausschneiden der Stoppkassette durch die Cre-Rekombinase das Tag spezifisch in den Lgr5-exprimierenden Stammzellen aktiviert, welche gleichzeitig mit Hilfe eines grünen Farbstoffes fluoreszenzmarkiert sind.

2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Es gibt wenige Mausmodelle, welche die sporadische Natur von Darmtumoren widerspiegeln. Wir haben ein einzigartiges Tumormodell, bei dem das Tumorantigen durch Tamoxifenapplikation organspezifisch angeschaltet werden kann, um eine spezifische Immunantwort zu analysieren.

Zur Untersuchung der Immunantwort gegen gastrointestinale Tumoren haben wir zum einen Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und zum anderen Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Kolontumormodells durch gerichtete Stammzelltransformation unter Nutzung des Lgr5-Promoters im Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell sowie der Vergleich mit der Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus. Dazu sollte in beiden Mausmodellen das Tumorstadium, die lokale oder systemische Toleranzentwicklung, der Antikörpertiter und die Überlebensrate entweder durch Tamoxifen-induzierte oder durch Tamoxifen-unabhängige stochastische Tag-Expression untersucht werden.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie unterscheidet sich die Dynamik der Tumorigenese bei gerichteter Stammzelltransformation im Vergleich zu der sporadischen Tumorentwicklung in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen (Czéh M et al., 2010, Oncogene)?
- Wie verläuft die systemische Toleranzentwicklung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen?
- Welche Tumoren entstehen in dem Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell?
- Welche Zellen im gastrointestinalen Trakt exprimieren Tag nach Aktivierung der Cre-Rekombinase?
- Ist die Tumorigenese in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag durch die Gabe von Tamoxifen effizienter als ausschließlich durch stochastische Tag-Expression?
- Wie effizient ist die Cre-Rekombination in den Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tieren?

Verwendet wurden in diesem Zusammenhang Methoden wie *In vivo* Kill-Aktivitätsanalysen, Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), durchflusszytometrische Untersuchungen, Tumorzelltransferexperimente und histologische Färbungen.

Um die Effizienz der Cre-Rekombinase im Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell untersuchen zu können, wurden die Mäuse mit der Rosa-RFP-Reportermaus verpaart und im FACS untersucht.

Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit sollten neben der Ergänzung des bisherigen Kenntnisstandes zur Toleranzentwicklung in den oben genannten Mausmodellen als Grundlage für weitere Forschung sowie Diskussion der pathophysiologischen Mechanismen und Testung neuartiger Therapeutika dienen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zelllinie 16.113

16.113

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Zelllinie 16.113 gearbeitet, die aus dem Kolontumor einer LoxP-Tag-Maus (Founder 16, Mausnummer 113) isoliert wurde und in hoher Menge Tag exprimiert. Die Zelllinie wurde in RPMI-Medium kultiviert. Bei Farbumschlag wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, gezählt und auf $0,25 \times 10^6$ Zellen pro große Zellkulturflasche neu eingestellt.

Die Zelllinie 16.113 wurde zur Immunisierung [7,112] im Rahmen eines *In vivo* Kill-Assays intraperitoneal in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 200 μ l PBS injiziert. Des Weiteren wurde die Zelllinie für Tumorwachstums-Experimente in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 200 μ l PBS verwendet.

3.1.2 Medien und Puffer

DMEM-Medium:

10% (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) (Pan), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in DMEM (Invitrogen).

Einfriermedium

90 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Pan), 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO).

Medium I (RPMI-1640)

10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Pan), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in RPMI (Invitrogen).

Durchflusszytometriepuffer

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,5 % Bovines Serumalbumin (BSA), 0,1% NaN_3 , 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).

Erythrozytenlysepuffer (ACK-Lyse)

10 mM KHCO_3 , 155 mM NH_4Cl , 0,1 mM Na_2EDTA , pH = 7,2.

Puffer für Gewebeerddau (RPMI-1640)

10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (Pan), 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (Gibco), 0,2 mg/ml Kollagenase *Clostridium histolyticum* (Sigma), 0,2 mg/ml Dispase II (Sigma), 10 $\mu\text{g/ml}$ DNase (Roche)

TAE-Puffer für Gelelektrophorese

50-facher TAE-Puffer enthält 242 g Tris-Base, 57,1 g Eisessig, 37,2 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$, ad 1 Liter H_2O , pH = 8.

TE-Puffer für DNA

10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH = 8, ad dd H_2O .

Zellysepuffer

10 ml NP40 Zellysepuffer (Invitrogen), 1 mM Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF), 1 Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche)

3.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3.1)

Reagenz (Abkürzung)	(Hersteller)
Agarose	(Merck, Darmstadt, BRD)
Antibiotikum/Antimykotikum (Anti/Anti)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Bovines Serumalbumin (BSA)	(Roth, Karlsruhe, BRD)
Calciumchloridlösung (50mM) (CaCl_2)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Carboxyfluoreszinester (CFSE)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Chloramphenicol (Cmr)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkir-

	chen, BRD)
Complete Protease Inhibitor Cocktail-Tabletten	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Pan Biotech GmbH, Aidenbach, BRD)
Dithiothreitol (DTT)	(AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD)
DNA-Marker EasyLadder I (EL I)	(Bioline, Luckenwalde, BRD)
Dulbecco modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Dulbecco Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (1-fach) (PBS)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Easycoll Separating Solution	(Biochrom AG, Berlin, BRD)
EDTA (Titriplex)	(Merck, Darmstadt, BRD)
Ethanol (EtOH)	(Merck, Darmstadt, BRD)
Ethidiumbromid (EtBr)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Eosin-Y-Alkoholische Lösung	(Merck, Darmstadt, BRD)
Fetales Kälberserum (FKS)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
D-(+)-Glukose (Glc)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
L-Glutamin (Glu)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Glutaraldehyd	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Glycerol	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Hämatoxylin II nach Gill	(Merck, Darmstadt, BRD)
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	(Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, BRD)
Histoclear (Xylolderivat)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Histomount™	(Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA)
4-Hydroxytamoxifen, T-6278 (4-OHT)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkir-

	chen, BRD)
Isofluran (Fluran)	(Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, BRD)
Isopropanol (IPA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
DNA-Ladepuffer, 5-fach	(Bioline, Luckenwalde, BRD)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Vorratslösung	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
Methanol (MeOH)	(Merck, Darmstadt, BRD)
Natriumacetat (NaOAc)	(Merck, Darmstadt, BRD)
0,85% Natriumchloridlösung (0,85%NaCl)	(Roth, Karlsruhe, BRD)
Natrium-Pyruvat	(Pan, Aidenbach, BRD)
Neomycin (G418)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
nicht-essenzielle Aminosäure-Lösung (MEM)	(Pan, Aidenbach, BRD)
O.C.T.Compound (OCT)	(Tissue Tek)
Olivenöl, steril filtriert	(Bertolli)
Paraffin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Paraformaldehyd 4 % oder 2 % (PFA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
PCR-Puffer mit/ohne MgCl ₂ , 10-fach	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
RPMI 1640-Medium (RPMI)	(Invitrogen, Karlsruhe, BRD)
Salzsäure (2 N HCl)	(aus rauchender Salzsäure 37% von Merck, Darmstadt, BRD)
10 % SDS-Lösung (10 % SDS)	(Merck, Darmstadt, BRD)
Stickstoff, flüssig (N ₂)	(Air Liquide)
Tamoxifen, T-5648	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Tris-Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung-Tween (T-PBS-Tween)	(Tween20 von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD; NaCl und Tris

	Base von Roth, Karlsruhe, BRD; KCl von Merck, Darmstadt, BRD)
Tris-Hydrochlorid	(Roth, Karlsruhe, BRD)
Trypanblau	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Tween 20	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
Weigert Eisenhämatoxylin Lösung A/B	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)

Agarose-Gel 1,5 % bzw. 1,8 %

- Ethidiumbromid
- DNA-Ladepuffer
- Längenstandard: EasyLadder I
- TAE-Puffer (1-fach)
- Ultra Pure Agarose (für 1,5 %-ige Gele) und High-Resolution Agarose (für 1,8 %-ige Gele)

ELISA

- Combitips (Eppendorf, Hamburg, BRD)
- 96-Well Platte (Nunc, Wiesbaden, BRD)

Mikroskopie

- Deckgläser (VWR, Darmstadt, BRD)
- Einbettkassetten für Organe (Roth, Karlsruhe, BRD)
- Objektträger (Dako, Hamburg, BRD)
- Schneidemesser (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, BRD)

QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA)

Das Kit wurde zur DNA-Extraktion von Formalin-fixiertem in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe verwendet. Die Extraktion wurde nach dem von Qiagen bereitgestellten Protokoll für FFPE-Gewebe durchgeführt.

Tierexperimente

- Einwegspritzen: 1 ml bis 60 ml (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- Injektionskanülen 20 Gauge (Blutentnahme), 22 Gauge intravenöse/subkutane/intraperitoneale Injektionen (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- Knopfkanüle für Gavage (Acufirm, Henry Schein Medical)
- Pipettenspitzen (Merck, Darmstadt, BRD)

Zellkultur

- Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden, BRD)
- Eppendorf-Röhrchen: 2 ml, 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, BRD)
- Falcon-Röhrchen: 15 ml, 50 ml (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- Petrischale (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- Sterile Pipetten: 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning Costar, Bodenheim, BRD)
- Zellkulturplatten: 6-, 12-, 24-Well-Platten (Corning Costar, Bodenheim, BRD)
- Zellkulturflaschen: T-25, T-75, T-150 (Merck, Darmstadt, BRD)
- Zellsieb: 40 µm , 100 µm (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)

3.1.4 Enzyme

- Dispase II, D4693-1G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
- DNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- Kollagenase *Clostridium histolyticum*, C6885-100MG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
- Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
- Taq-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- Trypsin [10 mg/ml] (Invitrogen, Karlsruhe, BRD)

3.1.5 Antikörper

Durchflusszytometrie

- 7-AAD, Cat.: 420404, Lot: B176770 (50 µg/ml), 1:100
- CD3ε-APC, Klon # 145-2C11, Isotyp: Hamster anti-Maus IgG_{2a}, 1:150
- CD4-PE, Klon #RM4-5, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:150

- CD4-FITC, Klon #RM4-5, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:200
- CD4-APC, Klon # RM4-5, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:100
- CD8 α -FITC, Klon #53-6.7, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:100
- CD8 α -PE, Klon #53-6.7, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:500
- CD44-APC, Klon #IM7, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2b}, 1:500
- CD45.2-APC, Klon #104, Isotyp: Maus anti-Maus IgG_{2a}, 1:200
- CD69-PE, Klon #H1.2F3, Isotyp: Hamster anti-Maus IgG, 1:1000
- CD326-Biotin-Streptavidin-FITC, Klon #G8.8, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:300
- F_c-Block, Klon #93, Isotyp: Ratte anti-Maus IgG_{2a}, 1:2000

Alle verwendeten Antikörper stammen von der Firma Biolegend (London, UK).

Histologie

- SV40 Large T und small t-Antikörper, Klon #PAb 108, Verdünnung 1:200 (BD Pharmingen, Hamburg, BRD); 2. Antikörper: biotinylierter Ziege anti-Maus-Antikörper, Verdünnung 1:200 (Dako, Glustrup, Dänemark)
- F_c-Block: Ratte anti-Maus IgG_{2b}, Klon #2.4G1, Verdünnung 1:100 (BD Pharmingen, Hamburg, BRD)

oder:

- SV40 Large T und small t-Antikörper, Klon #v-300 (sc-20800), Verdünnung 1:500 bis 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA); 2. Antikörper: biotinylierter Esel anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:200 (Dianova, Hamburg, BRD)
- 1. Antikörper: CD3-Antikörper, Klon #N1580, Verdünnung 1:10 (Dako, Glostrup, Dänemark); 2. Antikörper: biotinylierter Esel anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:200 (Dianova, Hamburg, BRD)

T-Zell-Depletion durch 30H12

Für die *in vivo* T-Zell-Depletion wurde der Thy 1.2-Antikörper, Klon #30H12 (BioXCell) und als Isotypkontrolle LTF-2 (BioXCell) verwendet.

ELISA

- 1. Antikörper: anti-SV40 Large T-Antikörper, Klon #PAb 100 (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
- 2. Antikörper: Biotin-SP-konjugierter Ziege anti-Maus F(ab')₂-Fragment-spezifischer IgG-Antikörper, polyklonal, Lot: 94022, Code: 115-066-062 (Jackson, Suffolk, UK), 1:20 000
- Avidin-Peroxidase, A3151-1MG, Code: 079K6038 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD), 1:400

3.1.6 Oligonukleotidprimer

Für Typisierungs- und Rekombinations-Polymerase-Kettenreaktionen verwendete Oligonukleotidprimer sind nachfolgend aufgelistet (Tabelle 3.2). Alle Oligonukleotidprimer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, BRD hergestellt.

Tabelle 3.2:

Primer	Sequenz (5' → 3')	Größe (Bp)
U12	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT	302
U13	AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA	
Cat 2	CAG TCA GTT GCT CAA TGT ACC	390
Cat 3	ACT GGT GAA ACT CAC CCA	
Cre forward	CCG GTT ATT CAA CTT GCA CC	149
Cre reverse	CTG CAT TAC CGG TCG ATG CAA C	
Lgr5 8060 common	CTG CTC TCT GCT CCC AGT CT	174 (mt) 298 (wt)
Lgr5 8061 wt reverse	ATA CCC CAT CCC TTT TGA GC	
Lgr5 olMR9402 mt reverse	GAA CTT CAG GGT CAG CTT GC	
LoxP ₁	CAT CAT TTT GGC AAA GAA TTC AAG C	1834/114
LoxP ₂	GCA AAT TTA AAG CGC TGA TGA TCC	

3.1.7 Geräte

Es wurden folgende aufgelistete Geräte verwendet (Tabelle 3.3):

Bezeichnung	(Hersteller)
Autoklav Typ17	(MELAG Medizintechnik, Berlin, BRD)
Bakterienschüttler GFL3033	(Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, BRD)
Brutschrank	(Mettler, Schwalbach, BRD)
CO ₂ Inkubator MCO 17AIC	(Sanyo, Japan)
Digitalkamera ColorView	(Olympus, Hamburg, BRD)
Digital Graphic Printer UP-D890	(Sony Professional Solutions Europe, Berlin, BRD)
ELISA-Reader Opsys MR	(Dynex Technologies, Berlin, BRD)
FACS Calibur/Canto	(Becton Dickinson, Heidelberg, BRD)
Feinwaage MC1	(Sartorius AG, Göttingen)
Flüssigstickstofftank	(Messer Griesheim, Griesheim, BRD)
Gefrierschrank (-20°C/ -80°C Ultra Low-Temp. V.I.P.)	(Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, BRD/Sanyo Electric Co, Ltd., Panasonic, Hamburg, BRD)
Geldokumentation BioDoc Analyse	(Biometra GmbH i. L., Göttingen, BRD)
Gelelektrophoresekammer	(BioRad Laboratories GmbH, München, BRD)
KSeries Cryostage System	(Jencons Scientific Inc., USA)
Kühlplatte CP60	(Microm Int., Walldorf, BRD)
Kühlschrank	(Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, BRD)
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	(Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, BRD)
Laborwaage EW600-2M	(Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, BRD)
Lichtmikroskop DMIL	(Leica Microsystems, Wetzlar, BRD)
Lysemaschine	(Beckman Coulter GmbH, Krefeld, BRD)
Mikroskop	(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Berlin, BRD)
Mikrotom Krystat HM560	(Microm Int. Walldorf, BRD)

Mikrowelle	(Siemens-Elektrogeräte GmbH, München, BRD)
Multitemp II Thermostatic Circulator 2219	(LKB Bromma, Schweden)
Paraffinstreckbad 25900	(MEDAX GmbH & Co. KG, Rendsburg, BRD)
Pasteur-Pipette	(VWR International GmbH, Dresden, BRD)
PCR-Thermocycler	(Biometra GmbH i. L., Göttingen, BRD)
pH-Meter 761	(Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, BRD)
Photometer	(Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling- Berzdorf, BRD)
Pipetten (Ein-/Mehrkanal, Multihub)	(Eppendorf, Hamburg, BRD)
Pipettierhilfe Swiftpet™	(Abimed GmbH, Bremen, BRD)
PowerPac 300/Basic	(BioRad Laboratories GmbH, München, BRD)
Schlittenmikrotom HM430	(Microm Int., Walldorf, BRD)
Schüttelinkubator Duomax 1030	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, BRD)
Schüttelinkubator GFL 3033	(Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, BRD)
Sterilwerkbank Heraeus	(Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, BRD)
Thermomixer Comfort	(Eppendorf, Hamburg, BRD)
Tischzentrifuge 5415D	(Eppendorf, Hamburg, BRD)
Vortexer Genie Reax 2000	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, BRD)
Wasserbad WB10	(Mettler, Schwalbach, BRD)
Zählkammer nach Neubauer	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD)
Zentrifuge 5840R	(Eppendorf, Hamburg, BRD)

3.2 Mausstämme, -zucht und -typisierung

Als experimentelle Tiere kamen folgende Mausstämme zum Einsatz:

C57BL/6

Die C57BL/6-Mäuse wurden bei der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, BRD) eingekauft. Sie sind einer der am besten charakterisierten und am meisten verwendeten Inzuchtstämme.

C57BL/6 x LoxP-Tag

LoxP-Tag-Mäuse wurden mit homozygoten C57BL/6-Mäusen verpaart um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Die Typisierung erfolgt mit Hilfe einer PCR aus Ohrstanzungen und dem Primerpaar CAT2/3.

Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-TAG

Heterozygote Lgr5-Cre-ER^{T2}-Tiere (B6.129P2-Lgr5^{tm1^(cre/ERT2)Cle}/J) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) gekauft und mit homozygoten LoxP-Tag-Tieren verpaart. Die Typisierung erfolgt mittels PCR aus Ohrstanzungen und dem Oligonukleotidprimerpaar Cre forward/reverse oder Lgr5 forward/reverse.

RAG-1^{-/-} oder RAG-2^{-/-}

RAG-1^{-/-}-Mäuse (B6.129S7-Rag1^{tm1^{Mom}}) und RAG-2^{-/-}-Mäuse (B6(Cg)-Rag2^{tm1.1^{Cgn}}/J) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) wurden homozygot verpaart.

ROSA26-RFP-Reporter-Maus

Rosa26-RFP-Tiere wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Schüler bereitgestellt und mit homozygoten Villin-Cre-ER^{T2}-Tieren bzw. Lgr5-Cre-ER^{T2}-Tieren verpaart. Die Typisierung erfolgte mit Hilfe von PCR aus Ohrstanzungen und dem Oligonukleotidprimerpaar Cre forward/ reverse.

Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-TAG

Vil-Cre-ER^{T2}-Tiere (B6.Cg-Tg(Vil-cre)997Gum/J) wurden bereits beschrieben und für elf Generationen mit C57BL/6-Mäusen zurückgekreuzt [113].

LoxP-Tag-Tiere wurden mit Vil-Cre-ER^{T2}-Tieren verpaart und die Nachkommen, die für beide Transgene heterozygot waren, wurden für Experimente genutzt. Die Genotypisierung erfolgte aus Ohrstanzungen mit Hilfe von PCRs und der Benutzung des Oligonukleotidprimerpaares Cat 2/3 (LoxP-Tag) beziehungsweise Cre forward/reverse (Vil-Cre-ER^{T2}).

Alle Tiere wurden in der, an die Charité Campus Benjamin Franklin, angeschlossenen Zucht und Haltung des FEM (Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin) bzw. am Campus Buch in der Tierhaltung des MDC gehalten.

Alle Mausstämme wurden unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Zucht und Haltung erfolgte gemäß den aktuellen Leitlinien des Tierschutzgesetzes. Die Mausexperimente wurden unter dem Tierversuchsantrag G 0328/05 (behördliche Genehmigung am 15. Dezember 2005) sowie G 0321/10 (behördliche Genehmigung am 28. März 2011) durchgeführt.

3.3 Methoden

3.3.1 *IN VITRO*-ANALYSEN UND ZELLKULTUR

3.3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und je nach Zellzahl in eine entsprechend große Zellkulturflasche (25/75/150cm³) gegeben, die mit Medium I (10/20/40 ml) befüllt wurde.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese gezählt und 1 x 10⁷ Zellen pro Aliquot eingefroren. Zum Ablösen der Zellen wurden sie zuvor ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/ EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach circa drei bis fünf Minuten Inkubationszeit im 37°C warmen Brutschrank wurden die Zellen mit einer Pipette in ein 50 ml großes, mit Medium gefülltes Falcon-Röhrchen übertragen und bei 1300 rpm à 4°C für fünf bis zehn Minuten herunterzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in Einfriermedium aufgenommen und als 1 ml Aliquot bei -80°C im Flüssigstickstofftank eingefroren.

3.3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen von der Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 50 ml PBS in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen.

Anschließend wurden 50 μ l Zellen mit 100 μ l PBS und 50 μ l Trypanblau in einem Eppendorf Reaktionsgefäß aufgenommen, daraus 50 μ l entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer alle vier Quadranten gezählt.

Anschließend wurde die Konzentration folgendermaßen berechnet:

$$[\text{Zellzahl}]_{\text{gesamt}} = [\text{Zellzahl}]_{\text{gezählt}} \times [\text{Faktor}]_{\text{Kammer}} (\sim 10^4) \times [\text{Faktor}]_{\text{Verdünnung}} (\sim 50)$$

3.3.1.3 Anti-SV40 Large T-ELISA

Zur Detektion von anti-Tag spezifischen Antikörpern wurde ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Dazu wurde eine 96 Well-Platte (Nunc, Wiesbaden, BRD) über Nacht mit 4 mg/ml rekombinantem SV40 Large T-Protein (Chimerx, WI, USA) bei 4°C in 2 %-igem Bovinen Serumalbumin (BSA) in T-PBS inkubiert. Am nächsten Morgen wurden noch freie Bindungsstellen der ELISA-Platte mit 5% BSA in TBS-Tween für eine Stunde bei 37°C geblockt. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift mit T-PBS-Tween.

Die Serumproben der angezeigten Mäuse wurden 1:50 verdünnt. Als Standard wurden ein Maus anti-SV40 Large T-Antikörper, Klon #PAb 100 (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml und Verdünnung von 1:50 bis 1:1000 beziehungsweise ein Labor-eigener Standard (Serum von gepoolten Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen) in einer Verdünnung von 1:20 (~ 5 000 Units) bis 1:43 740 (~ 2,29 Units) benutzt. Der erste Antikörper wurde mit den Serumproben zusammen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach drei Mal mit T-PBS-Tween gewaschen.

Der gebundene Antikörper wurde durch einen mit Biotin-SP-konjugierten Ziege anti-Maus F(ab')₂-Fragment-spezifischen IgG-Antikörper (Jackson, Suffolk, UK) mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C (Verdünnung 1:20 000) markiert.

Danach wurde die Platte erneut drei Mal mit T-PBS-Tween gewaschen und Avidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) in einer Konzentration von 1:400 dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut drei Mal gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Antikörpers wurde das OptEIA Substratreagens (BD Pharmingen, Hamburg, BRD)

hinzugegeben, nach 30 Minuten im Dunkeln mit 2 N HCl gestoppt und abschließend im ELISA-Reader gemessen.

3.3.1.4 Durchflusszytometrie

Es wurden multiparametrische Analysen am Durchflusszytometer (FACS) Canto oder Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) durchgeführt. Die darauffolgende Datenauswertung erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Antikörperfärbung im Blut

Für die Färbung der T-Lymphozyten wurden 50 µl EDTA-Blut in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit je 0,5 µl CD8-FITC und 0,3 µl CD4-PE und CD3-APC für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Danach wurden die Proben mit der Lysemaschine (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, BRD) fixiert und anschließend im FACS gemessen.

Antikörperfärbung in Milz und Lymphknoten

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurden für die Färbung der T-Zellen in der Milz und im Lymphknoten 1×10^6 Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit den jeweiligen Antikörpern in einer Konzentration von 1:100 (CD8-FITC) oder 1:200 (CD4-PE und CD3-APC) für 30 min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen für 10 min. bei 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer, wurden sie in 100 µl resuspendiert. Zur Messung im Durchflusszytometer wurden 50 µl der Zellsuspension in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Intestinale Stammzellen

Für die Färbung wurden die Zellen in 100 µl PBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % BSA mit F_c-Block in einer Verdünnung von 1:200 (CD45.2-APC) und 1:300 (CD326-bio-SA) für 30 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min. bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1 ml PBS mit 2 mM EDTA und eine Resuspension in 100 µl unter der Zugabe von 7-AAD (1:100) zehn Minuten vor Akquisition. Abschließend wurden 100 µl der

Einzelzellsuspension in 200 µl FACS-Puffer zur Messung im Durchflusszytometer aufgenommen.

Intraepitheliale Lymphozyten aus dem Darm

Für die Färbung der aus dem Darm isolierten T-Lymphozyten wurden diese in 100 µl PBS in einem FACS-Röhrchen aufgenommen und entweder mit 1 µl CD8-FITC oder 0,5 µl CD4-FITC, und je 0,2 µl CD44-APC und 0,1 µl CD69-PE für 15 min. bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden daraufhin einmalig mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und 5 min. vor der Messung mit 3 µl 7-AAD zur Kennzeichnung der toten Zellen angefärbt.

***In vivo* Kill**

Für die Analyse des *In vivo* Kill-Assays wurde nach Herstellung der Einzelzellsuspension durch ACK-Lyse der Empfängermilzen und einem darauffolgenden Waschschrift mit PBS, die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden nun 100 µl in 200 µl FACS-Puffer durchflusszytometrisch gemessen. Dazu wurden die [CFSE]_{hoch}- und [CFSE]_{niedrig}-Populationen in einem Gate betrachtet.

3.3.1.5 Isolierung von T-Lymphozyten und Splenozyten aus der Maus

Zur Isolation von Lymphozyten wurden der euthanisierten Maus die inguinalen, axillären und intraperitonealen Lymphknoten entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale gespült. Ebenso wurde Blut und die Milz entnommen. Die Milzen und Lymphknoten wurden mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebes und des Stempels einer 5 ml Spritze unter Spülung mit PBS zerrieben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Milzen einer Erythrozytenlyse unterzogen und mit einer Zählkammer nach Neubauer und Trypanblau-Färbung die Zellzahl bestimmt. Die Antikörperfärbung der T-Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.2 *IN VIVO*-EXPERIMENTE

3.3.2.1 Blutabnahme und Analyse

Zur Blutentnahme wurde die *V. facialis* mit einer 20 Gauge-Kanüle punktiert und das Blut in einem EDTA-Röhrchen für weitere Analysen aufgefangen.

Für Serumproben wurden die angezeigten Tiere alle zwei bis vier Wochen geblutet. Bei toten Tieren wurde zur Serumgewinnung das Herz mit einer 22 Gauge-Kanüle punktiert und das Blut für die Aufbewahrung in zwei Schritten bei 14 600 rpm für 30 min. bei 4°C zentrifugiert und das Serum bei -80°C eingelagert.

3.3.2.2 Tamoxifen- und 4-Hydroxtamoxifenapplikation

Zur Herstellung des Tamoxifens (T-5648, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) wurden 400 mg in 1 ml Ethanol gelöst bis durch zusätzliches Vortexen eine feine Suspension entstand. Danach wurden 19 ml steril filtriertes Olivenöl (Bertolli) hinzugegeben (Tamoxifenkonzentration von 20 mg/ml) und die Lösung wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für circa 20-30 Minuten in einem Wasserbad bei 55°C inkubiert, bis durch regelmäßiges Schütteln eine klare Lösung entstand. Dann wurde es in 2 ml große Eppendorf-Reaktionsgefäße steril abgefüllt.

Falls nicht anders beschrieben wurden den Mäusen 100 µl à 2 mg an fünf aufeinanderfolgenden Tagen per Gavage verabreicht. Das 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) wurde in DMSO gelöst und 200 µl à 0,5 mg intrarektal mit einer Knopfkanüle unter einer flachen Ketaminnarkose (1 ml setzt sich aus 0,340 µl Ketamin, 0,540 µl physiologische Kochsalzlösung und 0,120 µl Xylacin zusammen) verabreicht.

3.3.2.3 Transplantationsexperimente mit der Tumorzelllinie 16.113

Für die Transplantationsexperimente wurden 16.113-Zellen für mindestens zwei bis drei Tage vorher in Zellkultur genommen und bei Erreichen einer logarithmischen Wachstumsphase in 200 µl PBS à 1×10^6 Zellen subkutan in die linke Flanke gespritzt. Danach wurden die Tiere für mindestens 100 Tage beobachtet, d.h. es wurde mindestens zwei Mal pro Woche die Tumorgröße bestimmt. Dafür wurde der Tumordurchmesser in Breite, Länge und Höhe unter Zuhilfenahme eines

Messschiebers bestimmt und anschließend nach der Formel der Volumenbestimmung eines Ellipsoides berechnet:

$$V [\text{in mm}^3] = \pi/6 * a * b * c$$

wobei: a = Längsachse [mm] b = Querachse [mm] c = Höhenachse [mm]

Versuchsabbruchkriterien waren zum einen das Erreichen eines Tumordurchmessers von mehr als 15 mm x 15 mm x 15 mm oder zum anderen ein eindeutiger Gewichtsverlust des Tieres, exulzierende Stellen als Quelle für Infektionen, etc.

3.3.2.4 *In vivo* Kill-Assay

Acht bis zwölf Wochen alte, sechs Monate, zwölf Monate oder 24 Monate alte Mäuse wurden mit 1×10^7 Zellen 16.113 gelöst in 200 μl PBS intraperitoneal immunisiert.

Sieben Tage nach der Immunisierung wurde ein *In vivo* Kill-Assay gegen das dominante Epitop IV von Tag durchgeführt. Dazu wurden Splenozyten von C57BL/6-Tieren mit dem H2-Kb-restringiertem Tag-Peptid IV (VYDFLKL) für 15 min. bei Raumtemperatur beladen (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, BRD) - die Konzentration war 10 μg Peptid pro 10^7 Zellen/ml oder ohne Peptid. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mM Carboxyfluoreszinester (CFSE von Invitrogen, Karlsruhe, BRD) bei Raumtemperatur für 15 min. im Dunkeln inkubiert (mit Peptid-beladene Zellen sind $[\text{CFSE}]_{\text{hoch}}$) oder mit 0,1 mM CFSE (unbeladene Population ist $[\text{CFSE}]_{\text{niedrig}}$). Danach wurden sie ein Mal mit kaltem RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS und zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Nach einer kurzen durchflusszytometrischen Überprüfung der CFSE-Färbung und Gleichverteilung beider Populationen wurden die Zellen in einer 1:1 Ratio und einer Gesamtzahl von 2×10^7 pro Maus intravenös in den Augenplexus oder die Schwanzvene injiziert.

Nach circa 18 Stunden wurden die mit CFSE-gekennzeichneten Zellen in der Empfängermilz mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Der *In vivo* Kill wurde folgendermaßen berechnet: die zytolytische Aktivität in den naiven Tieren wurde gleich Null gesetzt und

$$\% \text{ des spezifischen Kills} = (1 - (\text{Ratio aus } [\text{Maus}]_{\text{Kontrolle}} / [\text{Maus}]_{\text{immunisiert}})) \times 100,$$

wobei die Ratio die Prozentzahl aus $[\text{CFSE}]_{\text{niedrig}} / [\text{CFSE}]_{\text{hoch}}$ ist [112].

3.3.2.5 T-Zell-Depletion durch anti-Thy 1.2

Für die Depletion der T-Zellen wurde der Antikörper anti-Thy 1.2, Klon #30H12 und als Negativkontrolle der dazugehörige Isotyp Ratte IgG_{2b} (anti-KLH), Klon #LTF-2 (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) verwendet. Die Antikörper wurden mit PBS verdünnt und in einer Konzentration von 500 µl à 500 µg alle drei Tage intraperitoneal gespritzt.

3.3.2.6 Isolierung intestinaler Stammzellen

Zur Gewinnung intestinaler Stammzellen wurden den euthanisierten Mäusen jeweils sowohl der gesamte Dünndarm als auch das Kolon entnommen und zur Entfernung der Faeces mit kaltem PBS gespült. Die Gewebe wurden dann in einer mit PBS und 5 mM Na₂EDTA gefüllten Petrischale aufgefangen. Vom Dünndarm wurde ein circa 10 cm langes Stück longitudinal mit Hilfe eines Skalpell aufgeschnitten und nach kräftigem Ausschütteln der Villi und Krypten in einem 50 ml Falcon-Röhrchen die Darmhülle verworfen. Das Kolon wurde über ein 40 µm Zellsieb gerieben und anschließend ebenso ausgeschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 1200 rpm und unter Hinzufügen von 3 ml des Verdaumediums pro Röhrchen wurden die Zellen bei 37°C für 15 min. inkubiert und alle zwei Minuten gut geschüttelt. Die Reaktion wurde dann mit 30 ml HBSS abgestoppt und die Flüssigkeit mit den aus dem Zellverband gelösten Zellen über ein 40 µm Zellsieb erneut filtriert. Es folgten ein bis zwei Waschschritte mit HBSS und dann die Resuspension der Zellen in 100 µl PBS mit 2 mM EDTA.

3.3.2.7 Gewinnung intraepithelialer Lymphozyten aus dem Darm

Um die Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Lymphozyten zu analysieren wurde den Mäusen an fünf konsekutiven Tagen Tamoxifen per Gavage gegeben und 7 Tage nach der letzten Tamoxifenverabreichung die T-Zellen aus dem Darm isoliert. Dazu wurde sowohl das Kolon als auch der Dünndarm aus der euthanisierten Maus entnommen und jeweils der Länge nach aufgeschnitten. Circa 3-4 cm lange Darmstücke wurden nach der Entfernung der Faeces in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, welches mit 5 ml HBSS gefüllt war. Nach dem Absetzen der Darmstücke auf

dem Boden des Röhrchens wurde der Überstand abpipettiert und mit 20 ml HBSS mit 0,1 M EDTA und 15 mg/100 ml DTT und 8 % FKS aufgefüllt und für 15 min. bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Danach wurde der Überstand erneut abpipettiert und in einem weiteren Falcon-Röhrchen mit Medium I gesammelt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Darmstücke gepoolt und nochmals mit Medium I für 15 min. bei 37°C und 250 rpm geschüttelt.

Anschließend wurden alle Überstände durch einen 100 µm Zellsieb gegeben und dann für 10 min. und 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Pellets wurden in 5 ml 40%-igem Percoll resuspendiert, auf 5 ml 100 %-igem Percoll aufgeschichtet und darauffolgend für 25 min. bei 1000 g (ohne Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen und in PBS für 10 min. bei 1600 rpm auf 4°C zentrifugiert. Es folgte erneut ein Waschschrift mit PBS. Die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und in zwei Gruppen gefärbt.

3.3.2.8 Analyse der Tumorentwicklung

Die Mäuse, die einen deutlichen Tumor entwickelt hatten oder andere Stresssymptome wie beispielsweise Gewichtsverlust, kränkliches Fell, Darmprolaps, etc. zeigten, wurden einer kompletten Nekropsie unterzogen. Hierzu wurden die Tiere entweder mit Isofluran oder durch zervikale Dislokation euthanisiert. Die meisten Tumoren konnten bereits makroskopisch identifiziert werden.

3.3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.3.1 DNA-Amplifikation aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE)-Gewebe

Zur Isolierung der DNA aus dem Formaldehyd-fixierten Gewebe wurden circa zehn 20 µm dicke Schnitte für mindestens sechs Stunden im 37°C Brutschrank inkubiert, um das Gewebe vom umliegenden Paraffin zu trennen. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Skalpell von dem Objektträger unter mikroskopischer Sicht abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurde das Gewebe mit dem QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA) und zugehörigem Protokoll „DNA

Purification from Tissues“, S. 33-36) aufgereinigt. Die Lagerung der DNA erfolgte gelöst in 100 µl dH₂O bei 4°C für einige Wochen.

3.3.3.2 Nachweise der Cre-/LoxP-Rekombination mittels PCR

Zur quantitativen Bestimmung der DNA erfolgte vor der Polymerase-Kettenreaktion eine photometrische Messung. Dazu wurden die Proben 1:10 mit ddH₂O verdünnt und in einer Küvette (UVette, Eppendorf, Hamburg, BRD) im Photometer gemessen. Die Reinheit der aufgereinigten DNA wurde anhand des Quotienten aus OD₂₆₀ / OD₂₈₀ beurteilt ($\geq 1,8$).

Anschließend wurde die PCR wie folgt (pro Probe) angesetzt:

Puffer (mit MgCl ₂)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Oligonukleotidprimer LoxP ₁ (20 mM)	0,8 µl
Oligonukleotidprimer LoxP ₂ (20 mM)	0,8 µl
Taq	0,25 µl
DNA-Probe	100 ng
dH ₂ O	ad 50 µl

Die PCR lief den Standardmethoden folgend in einem Thermocycler (Biometra GmbH i. L., Göttingen, BRD). Nach Beendigung der DNA-Amplifizierung wurden die Proben mit 2 µl Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde, BRD) beladen, zusammen mit dem Längensstandard Easyladder I (Bioline, Luckenwalde, BRD) in die Taschen eines 1,8 %-igen Agarosegels (High Resolution Agarose, Roth, Karlsruhe, BRD) aufgetragen und für 40 Minuten bei 90 Volt in einer Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD) aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Gelauswertung mit Hilfe der Geldokumentation (Biometra GmbH i. L., Göttingen, BRD): bei Erscheinen einer 114 Basenpaaren langen Bande hat die Cre-/LoxP-Rekombination stattgefunden; bei Auftreten einer 1834 Basenpaaren großen Bande hingegen haben die Zellen nicht rekombiniert.

3.3.4 HISTOCHEMIE

3.3.4.1 Präparation der Paraffinschnitte

Die entnommenen Organe wurden in Einbettkassetten für eine Nacht in 4 % Formaldehyd eingelegt und anschließend in 4°C kaltem PBS gelagert.

Zum Entwässern der Gewebe unterliefen diese einer automatisierten Alkoholreihe in der Pathologie im Klinikum Benjamin Franklin. Das Einbetten in Paraffin erfolgte ebenso dort.

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe einer Kühlplatte auf circa 18-19°C herunter gekühlt und am Schlittenmikrotom 1 µm dünn geschnitten. Zwei bis drei Organe wurden nach Überführung in das Paraffinstreckbad auf einen Objektträger aufgenommen und anschließend histologisch angefärbt und untersucht.

3.3.4.2 CD3-Färbung

Für die CD3-Färbung wurde das Gewebe zunächst mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) angefärbt. Dazu wurden die Schnitte zur Entfernung der Paraffinreste mit dem Xylolderivat HistoClear (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD) für 15 min. gereinigt und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 % EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, ddH₂O) mit jeweils 5 min. Inkubationszeit entwässert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit einer Hämatoxylinlösung für fünf Minuten mit einem darauffolgenden Waschschrift in ddH₂O. Zum Intensivieren der Färbung wurden die Schnitte für circa fünf bis zehn Minuten unter alkalisches Leitungswasser gehalten. Das Zytoplasma wurde mit einer kurzen Inkubationszeit mit Eosin angefärbt und überflüssiger Farbstoff wurde mit ddH₂O entfernt. Anschließend durchliefen die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe und wurden nochmals mit HistoClear gereinigt.

Die fixierten Gewebeproben wurden mit einem CD3-Antikörper, Klon #N1580 (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer 1:10 Verdünnung angefärbt und das gebundene Protein mit einem zweiten biotinylierten Esel anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg, BRD) in 1:200 Verdünnung detektiert. Die Eindeckelung erfolgte mit HistoMount.

3.3.4.3 Tag-Färbung

Die H&E-Färbung erfolgte ebenso wie oben beschrieben und SV40 Tag-Protein wurde mit einem SV40 Large T und small t-Antikörper, Klon #PAb 108 (BD Pharmingen, Hamburg, BRD) in einer 1:200 Verdünnung angefärbt. Zur Detektion des gebundenen Proteins wurde als zweiter Antikörper ein aus der Ziege gewonnener biotinylierter anti-Maus-Antikörper (Dako, Glustrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200 angewandt. Die Eindeckelung erfolgte mit Histomount.

In den Experimenten mit Tamoxifengabe wurde ein polyklonaler SV40 Large T und small t-Antikörper, Klon #v300 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) eingesetzt. Als zweiter Antikörper zur Detektion des gebundenen Proteins wurde ein aus dem Esel gewonnener biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, BRD) in einer Verdünnung von 1:200 gebraucht.

3.3.5 STATISTISCHE ANALYSEN

Überlebenskurve

Für die Überlebenskurven wurde eine Kaplan-Meier-Darstellung gewählt. Als Abtötungskriterium wurden ein deutlich tastbarer Tumor oder offensichtliche Krankheitssymptome wie starker Gewichtsverlust, buckliges Aussehen, struppiges Fell, offene Wunden, etc. festgelegt. Die Tiere wurden per Genickbruch euthanisiert und die bei einer Nekropsie makroskopisch sichtbaren Tumoren aufgezeichnet. Der Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven von unterschiedlichen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Log-Rank Tests und einem p-Wert von $\leq 0,05$ als Signifikanzschwelle.

***In vivo* Kill-Aktivität**

Die Ergebnisse des *In vivo* Kill-Assays wurden in den verschiedenen Gruppen eingeteilt als Streudiagramm mit einer den Mittelwert anzeigenden Linie dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der t-Test mit $p \leq 0,05$ als Signifikanzschwelle vollzogen.

ELISA

Die $[OD]_{\text{Mittelwert}}$ wurde analog zur Analyse der *In vivo* Kill-Aktivität als Streudiagramm mit verschiedenen Gruppen aufgetragen, wobei eine Linie den Mittelwert

beziehungsweise den Median angibt. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen wurde ebenso der t-Test mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als Signifikanzschwelle berechnet.

Zellzählung

Für die Auswertung der Schnitte mit Bestimmung der Anzahl der T-Zellen und Tag-positiven Zellen wurden pro Maus fünf „High Power Fields“ (HPF, 400-fache Vergrößerung) verblindet gezählt und als Balkendiagramme mit Standardabweichung dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Analyse der Immunantwort gegen Tumoren in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen ohne Tamoxifenapplikation

4.1.1 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter eine Toleranz der spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegen das dominante Epitop IV von Tag

Wir vermuteten, dass ähnlich wie in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen [114], auch bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tieren eine stochastische, Tamoxifen-unabhängige Tag-Expression auftritt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Tag-spezifische Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL) von Lgr5-CreER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen verschiedenen Alters in einem *In vivo* Kill-Assay gegen das dominante Tag-Epitop Peptid IV untersucht (Abbildung 4.1 a, b). Darin zeigte sich, dass diese mit zunehmendem Alter eine ZTL-Toleranz gegen Peptid IV entwickelten. Während zwei Monate alte Mäuse noch eine durchschnittliche Kill-Aktivität von 71,3 % ($n = 11$) hatten, war die zytolytische Aktivität Tag-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten im Alter von sechs Monaten bereits deutlich reduziert (Mittelwert 26,7 %, $n = 8$). Ab einem Alter von circa einem Jahr (17,1 %, $n = 7$) war die Mehrzahl der Mäuse ZTL-tolerant gegen Tag. Der Genotyp der vier Mäuse, die selbst in hohem Alter noch nicht tolerant waren, wurde anhand einer PCR aus Formalin-fixiertem Gewebe nachgewiesen (Abbildung 4.1 d, e). Um zu zeigen, dass diese Toleranz aufgrund der durch Cre-Rekombination stattgefundenen Tag-Expression auftritt und es sich nicht um einen allgemeinen Effekt des Alterns handelt [115], wurden C57BL/6-Mäuse im Alter von 18-22 Monaten ebenso in einem *In vivo* Kill-Assay analysiert. Darin zeigten diese noch eine deutlich höhere spezifische ZTL-Aktivität (43,3 %, $n = 8$) als Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere der gleichen Altersgruppe (13,6 %, $n = 11$).

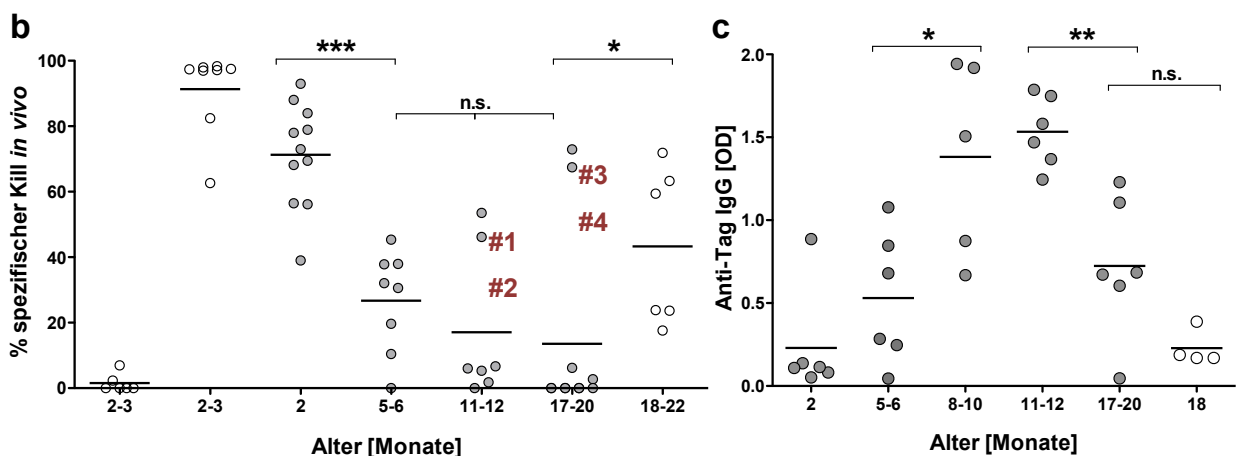
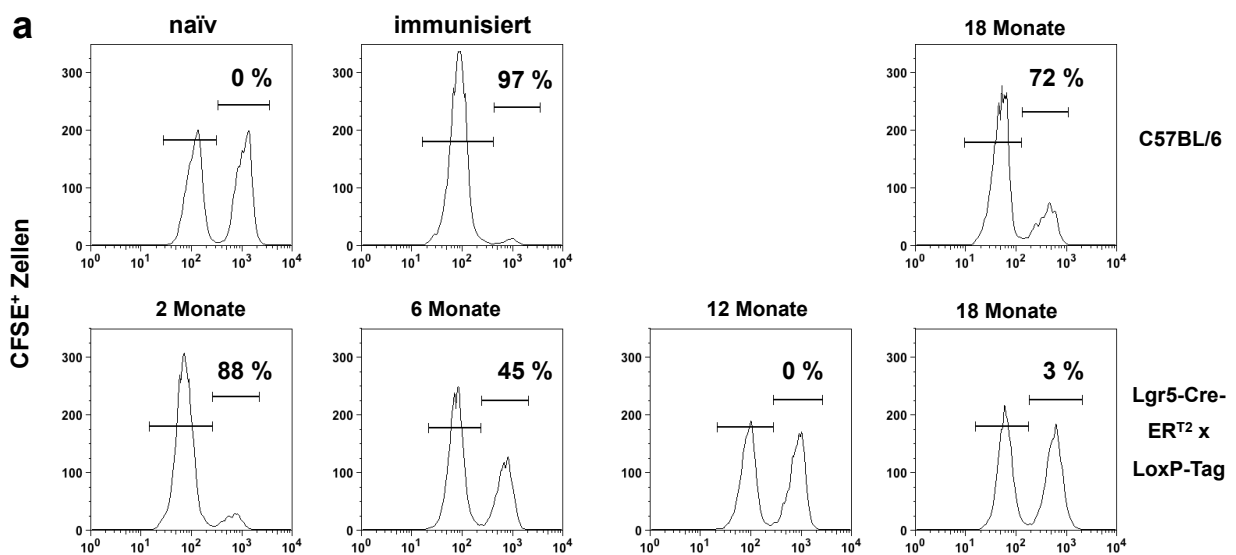
4.1.2 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse produzieren IgG-Antikörper gegen Tag

Da die Tiere im Alter von circa einem halben Jahr eine Toleranz der anti-Tag-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten zeigten, wurde ebenso das CD4⁺ T-Helferzellen-

Kompartiment untersucht. Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse konnten, ebenso wie Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere, spezifische anti-Tag IgG-Antikörper beim Immunglobulin-Klassenwechsel produzieren (Abbildung 4.1 c). Das deutete auf Tag-spezifische CD4⁺ T-Zell-Hilfe hin.

Ab einem Alter von sechs Monaten war ein relevanter anti-Tag IgG-Titer messbar, der bei Mäusen ungefähr im Alter von acht bis zwölf Monaten sein Plateau erreichte und danach wieder abnahm. Um die Spezifität des anti-Tag IgG-Titers zu überprüfen wurden 1,5 Jahre alte C57BL/6-Tiere mit Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen der gleichen Altersgruppe verglichen und zeigten im ELISA nur eine unspezifische anti-Tag IgG-Anfärbung.

Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Höhe des anti-Tag IgG-Titers mit der *In vivo* Kill-Aktivität festgestellt werden.



Ähnlich wie bei Czéh et al. (2010) hatten alte Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse (19-20 Monate alt) nur eine ZTL-Aktivität von 11.02 ± 15.06 % kill (n=7)

● Lgr5-CreER^{T2} x LoxP-Tag
○ C57BL/6

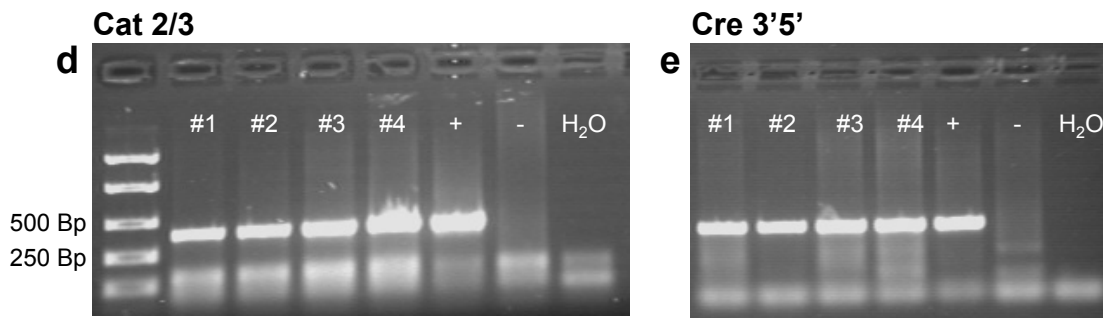


Abbildung 4.1: Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln mit dem Alter eine Peptid IV-Toleranz der CD8⁺ T-Lymphozyten trotz Tag-spezifischer IgG-Produktion. **a/b** *In vivo* Kill-Assays wurden durchgeführt wie in Material & Methoden beschrieben. **a** Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Beispiel pro Gruppe. **b** Die Daten der *In vivo* Kill-Assays wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Genotypen sind anhand der Legende ersichtlich. Jeder Punkt stellt eine Maus dar. Der Querbalken gibt den Mittelwert an. Die C57BL/6-Mäuse dienten als naive (links außen) bzw. immunisierte Kontrollen. **b/c** $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) **c** Anti-Tag-spezifische IgG wurden mit ELISA bestimmt. Die Produktion Tag-spezifischer Antikörper nahm mit dem Alter zu bis mit ca. 11-12 Monaten ein Plateau erreicht wurde. Trotz geringerer Menge von IgG im Alter (17-20 Monate) war dies ein spezifischer Effekt, da C57BL/6-Mäuse nur eine unspezifische Anfärbung im ELISA aufwiesen. **d** Die Mäuse aus dem *In vivo* Kill-Assay mit hoher ZTL-Aktivität wurden aus FFPE-Gewebe nachtypisiert. Eine β -Aktin-PCR (nicht dargestellt) diente als Kontrolle.

4.1.3 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln Tag-positive Tumoren

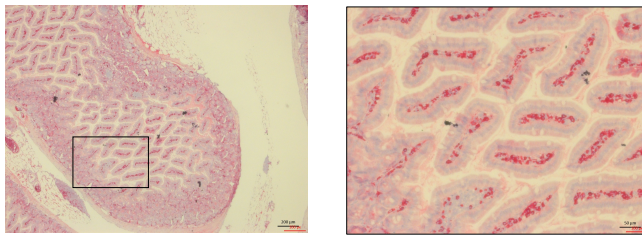
Die Mäuse wurden hinsichtlich der Entwicklung von Tumoren genauer untersucht. Keines der Tiere, das älter als 17 Monate war ($n = 14$) entwickelte einen makroskopischen oder mikroskopischen Tumor im Dünndarm oder Kolon (Abbildung 4.2 a). Dagegen traten andere Tumoren in Organen wie Pankreas ($n = 3$), Niere ($n = 1$) oder Leber ($n = 1$) auf (Abbildung 4.2 c). Die Tumoren wurden hinsichtlich der Expression von Tag histologisch untersucht. Sowohl die Pankreastumoren als auch der Nierentumor exprimierten Tag, der Lebertumor dagegen war in den angefärbten drei konsekutiven Schnitten negativ für Tag. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Expression von Lgr5-positiven Stammzellen im Pankreas hin.

Zum Vergleich erfolgte eine makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse, die älter als 17 Monate waren ($n = 12$). 7/12 Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere hatten zum Tötungszeitpunkt einen Tag-positiven Dünndarmtumor, 5/12 einen Tag-exprimierenden Kolontumor (Abbildung 4.2 b). In 2/12 Tieren war ein Tag-positiver Nierentumor feststellbar und in einer Maus ein für Tag negativer Lebertumor (Abbildung 4.2 d). 4/12 Tiere wiesen in Dün- und Dickdarm Tag-exprimierende Läsionen auf.

a **Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag (n = 14)**

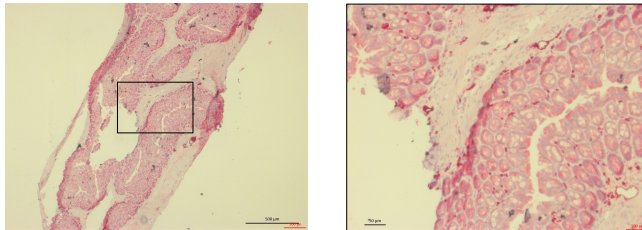
**Dünn-
darm**

0/14



**Dick-
darm**

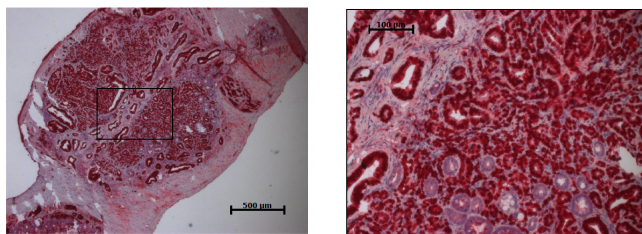
0/14



b **Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag (n = 12)**

**Dünn-
darm**

7/12



**Dick-
darm**

5/12

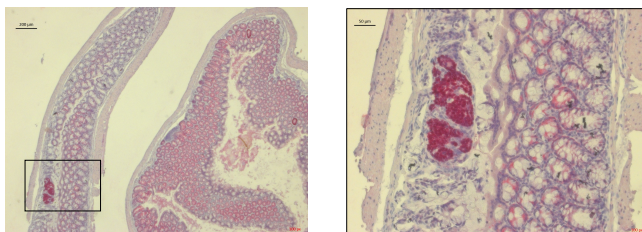


Abbildung 4.2: Sowohl Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag als auch Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag Mäuse zeigten histologisch Tag-positive Läsionen auf.

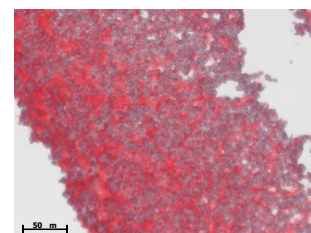
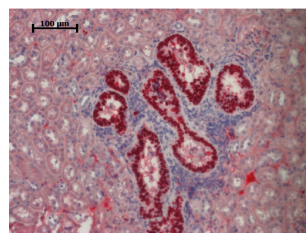
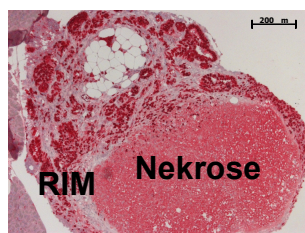
a Keines der untersuchten Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere zeigte Tag-positive Läsionen in Dünn- oder Dickdarm (es wurden jeweils drei konsekutive Schnitte beurteilt).

b Dargestellt sind zwei repräsentative Bilder aus einem Tumor im Dünndarm und einer Tag-positiven Läsion im Dickdarm von Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen.

c/d Abgebildet sind weitere Tumoren verschiedener Entität.

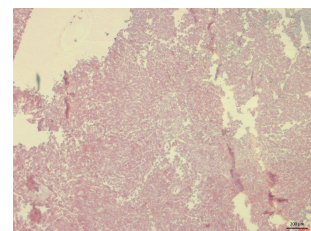
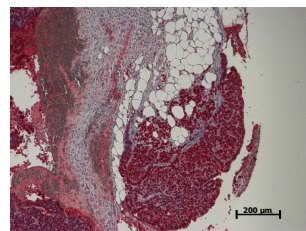
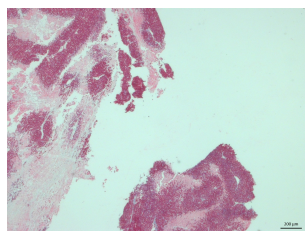
c **Pankreas 3/14** **Niere 1/14** **Leber 1/14**

**Lgr5-Cre-
ER^{T2} x
LoxP-Tag
(n = 14)**



d **Niere 2/12** **Leber 1/12**

**Vil-Cre-
ER^{T2} x
LoxP-Tag
(n = 12)**



4.1.4 In den Tag-exprimierenden Tumoren hat Cre-/LoxP-Rekombination stattgefunden

Um zu überprüfen, ob die Entstehung der Tumore in Pankreas und Niere in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen durch Cre-/LoxP-Rekombination, d.h. durch sog. „Leakiness“ der Stopp-Kassette, stattgefunden hat, wurde die DNA aus dem Formalin-fixierten Gewebe extrahiert und mit Hilfe von LoxP₁-/LoxP₂-Primern in einer PCR amplifiziert.

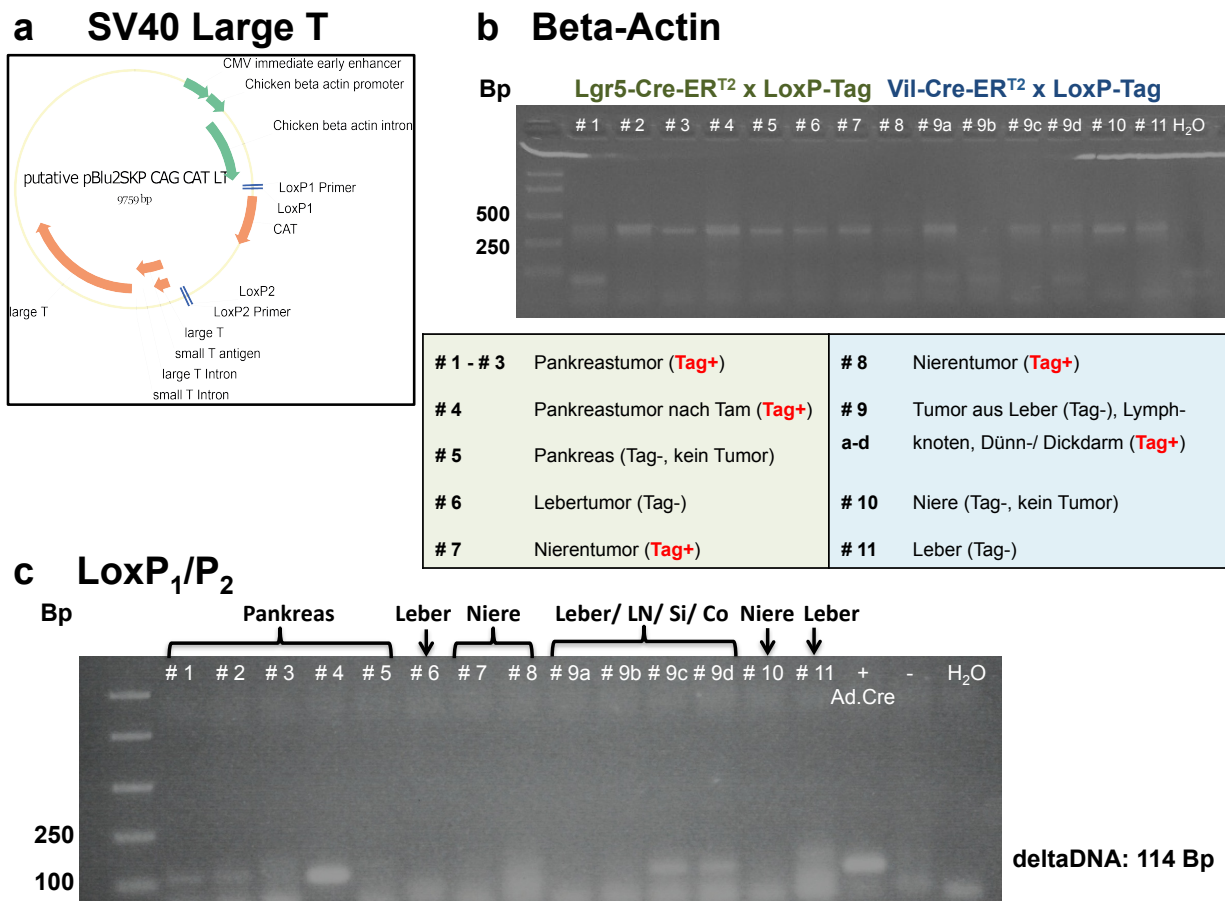


Abbildung 4.3: Nachweis der Cre-/ LoxP-Rekombination.

a Genomischer Aufbau des SV40-Konstrukts. **b** Die DNA der isolierten Tumoren wurde aus FFPE-Gewebe extrahiert und in einer β -Aktin PCR auf Qualität überprüft. #1-7 sind Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere; #8-11 sind Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere. **c** Die Rekombination konnte anhand des kurzen DNA-Fragments bei 114 Bp in den vier Pankreastumoren und in Dünn- und Dickdarm belegt werden. Lebergewebe einer mit Ad.Cre injizierten Maus diente als positive Kontrolle für die PCR.

Für das nicht-rekombinierte Allel zeigt sich normalerweise eine Bande bei 1834 Basenpaaren (Bp). In Folge von Rekombination wird das CAT-Gen zwischen den zwei LoxP-Integrationssequenzen ausgeschnitten und es ist eine 114 Bp große Bande detektierbar. Normalerweise sind nach Rekombination beide Banden sichtbar, da im

umliegenden Stroma oder gesunden Gewebe nicht-rekombinierte DNA ebenfalls vorhanden ist. Allerdings wurde die PCR durch Anpassung der Elongationszeit so modifiziert, dass nur noch die kurze und damit die entscheidendere Bande nach Rekombination sichtbar war.

Bei der Analyse der Tumoren aus Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen, die älter als 17 Monate waren, zeigte sich eine kurze Bande bei 2/3 Pankreastumoren in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen. Als Positivkontrolle wurde ein Pankreastumor des gleichen Mausstammes nach Tamoxifenapplikation verwendet. Die Negativkontrolle war ein nicht-tumoröses Tag-negatives Pankreas. Sowohl im histologisch Tag-negativen Lebertumor als auch im Tag-positiven Nierentumor zeigte sich keine Bande.

Der Nieren- und Lebertumor von Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen zeigte keine Rekombinationsbande. Allerdings hatte Cre-/LoxP-Rekombination im Tag-positiven Dün- und Dickdarmtumor des gleichen Tieres stattgefunden. Isolierte DNA aus einer makroskopisch und mikroskopisch unauffälligen Niere und Leber des gleichen Mausstammes wurden als negative Kontrollen auf das Gel mit aufgetragen und zeigten ebenso keine Rekombinationsbande.

4.2 Analyse der Immunantwort gegen Tumoren in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen nach Tamoxifengabe

4.2.1 Zwei bis vier Monate nach Tamoxifenapplikation entwickeln Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse eine dichotome ZTL-Toleranz gegen Peptid IV

In mehreren *In vivo* Kill-Assays wurde das Toleranzverhalten der CD8⁺ T-Zellen in beiden Mausstämmen verglichen (Abbildung 4.4 a). Darin zeigte sich, dass Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse, ebenso wie ohne Tamoxifenbehandlung, bereits nach zwei bis vier Monaten nach Tamoxifen tolerant sind ($n = 10$). Dagegen verfügten Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tiere noch über eine Kill-Aktivität von 68,92 % (Median) ($n = 7$). Über die Zeit zeigte sich eine dichotome Toleranzentwicklung bei beiden Mausstämmen, d.h. einige Tiere hatten selbst nach 12 Monaten nach Tamoxifengabe noch einen Kill von über 80 % und andere Tiere dagegen hatten nur einen Kill von unter 30 %. Das deutet zum einen darauf hin, dass es sich um eine heterogene Gruppe handelte. Zum anderen

ist aus der Abbildung ersichtlich, dass über alle Zeitperioden hinweg der Kill von Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen im Median größer war als der von Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen. Neben *In vivo* Kill-Assays sind Tumorzelltransplantationsexperimente ein weiteres wichtiges Tool um systemische Toleranz im Mausmodell zu untersuchen. Neben der CD8⁺ T-Zell-Toleranz spielen hier die CD4⁺ T-Lymphozyten eine essentielle Rolle. Es wurden 1 x 10⁶ Zellen 16.113 subkutan gespritzt (Abbildung 4.4 d). Die Mehrheit der LoxP-Tag-Mäuse akzeptierten 16.113-Zellen ab einem Jahr (3/5) und im Alter von circa zwei Jahren (12/15). Sowohl Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- als auch Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse mit Tamoxifen konnten 16.113 sechs Monate (Lgr5: 0/5, Vil: 0/3) bzw. zwölf Monate danach (Lgr5: 0/5, Vil: 0/3) noch abstoßen. Auch ohne Tamoxifengabe haben beide Mausstämme 16.113 abgestoßen. Erst ab einem Alter von über 24 Monaten akzeptierten 2/10 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und 1/7 Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse 16.113-Zellen.

a Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag nach Tamoxifen

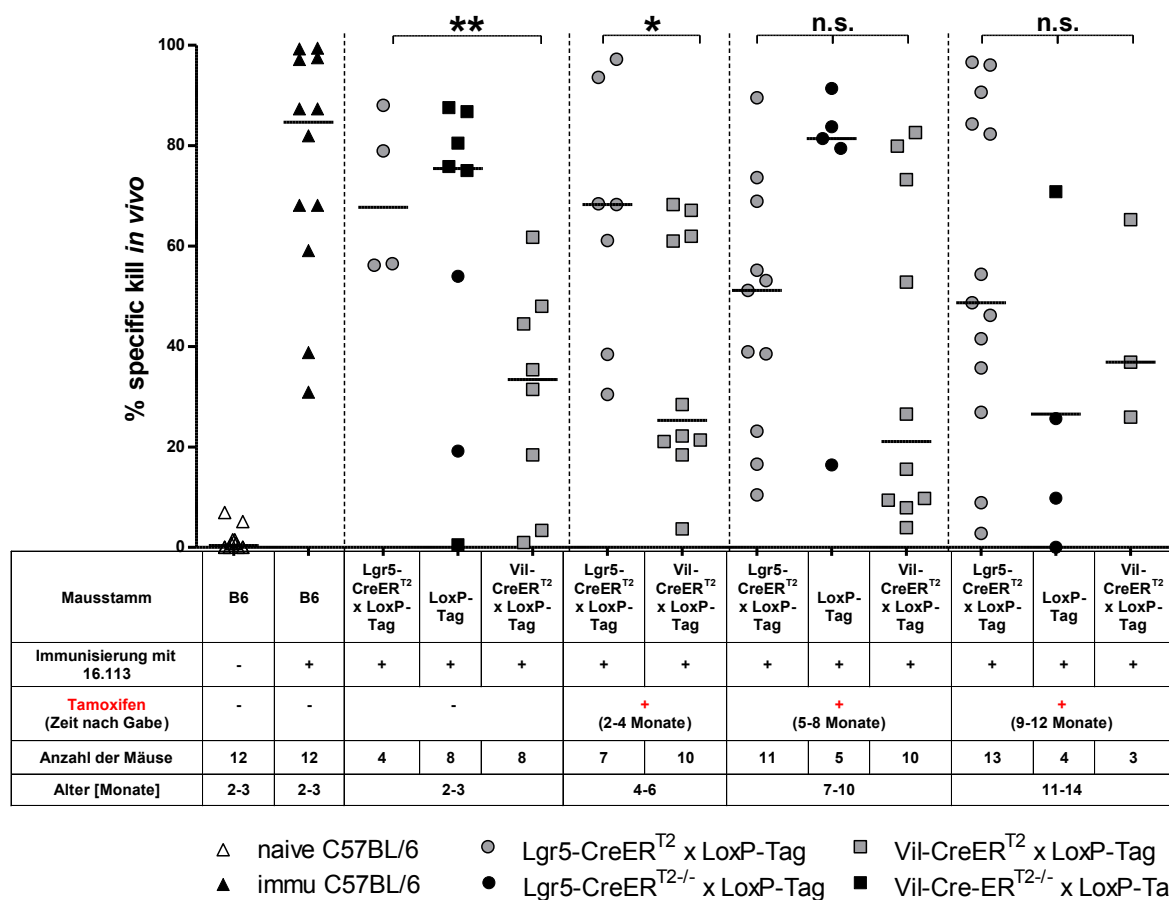


Abbildung 4.4 a: *In vivo* Kill-Assays wurden wie in Material & Methoden beschrieben durchgeführt. Genotypen, Immunisierung, Tamoxifengabe, Anzahl der Mäuse und Alter jeder Gruppe ist in Form einer Tabelle angegeben. Die Querbalken geben den Median an. p-Wert < 0,05 (*), p-Wert < 0,01 (**)

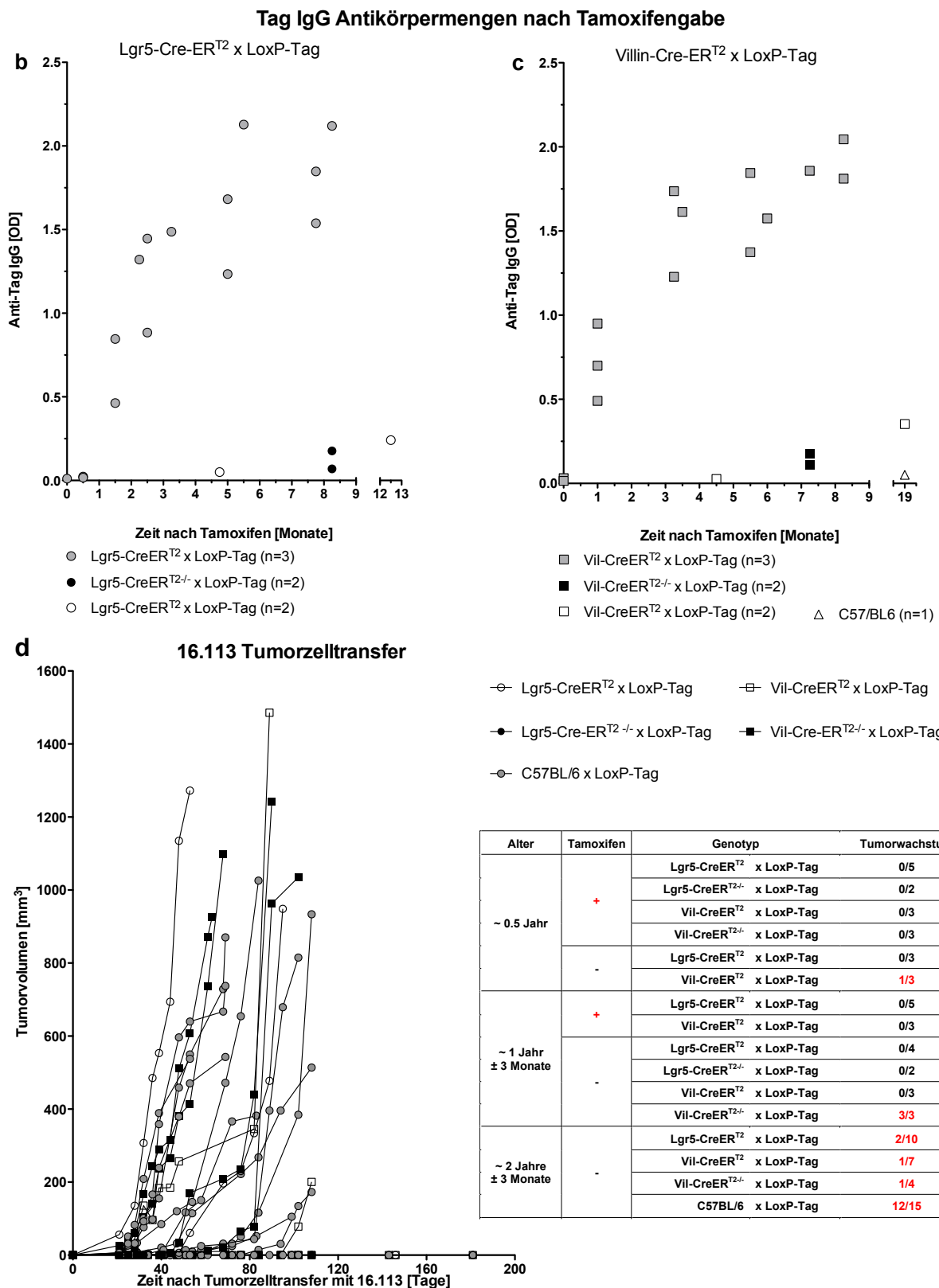


Abbildung 4.4 b-d: b/c Die Antikörpermenge wurde mittels ELISA (alle Proben auf einer 96 Well-Platte) gemessen. Genotyp/ Anzahl pro Gruppe sind anhand der Legende ersichtlich (weißes Symbol ohne Tamoxifen). d Im Transplantationsexperiment wurden 1×10^6 Zellen 16.113 auf 200 μ l PBS subkutan injiziert. Der Graph repräsentiert drei unabhängige Experimente. 16.113 ist in allen RAG-Mäusen innerhalb von 3 Wochen ausgewachsen ($x = 5,240 \text{ mm}^3$, $n = 7$; hier nicht abgebildet). Die Ratio der ausgewachsenen Tumore ist rot gekennzeichnet.

4.2.2 Sowohl Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- als auch Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse entwickeln hohe anti-Tag-spezifische IgG-Titer

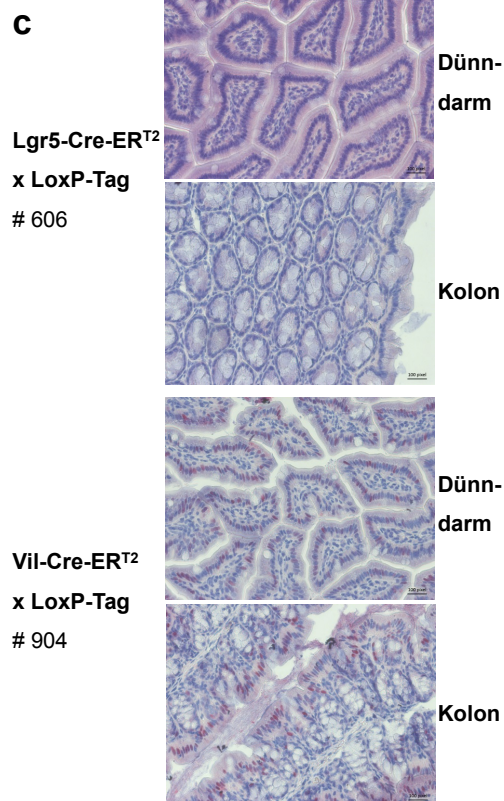
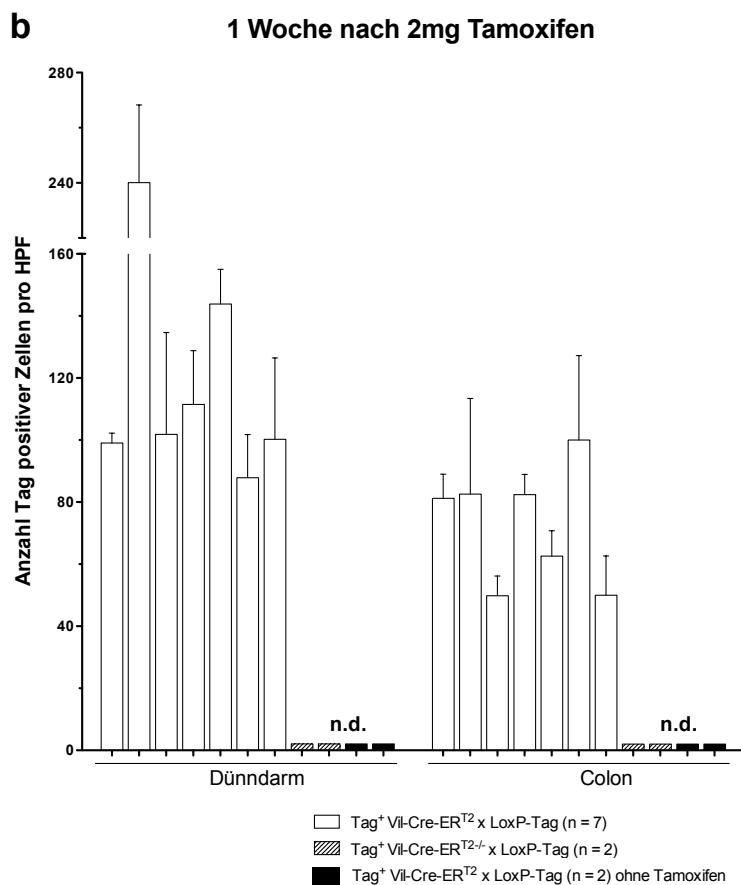
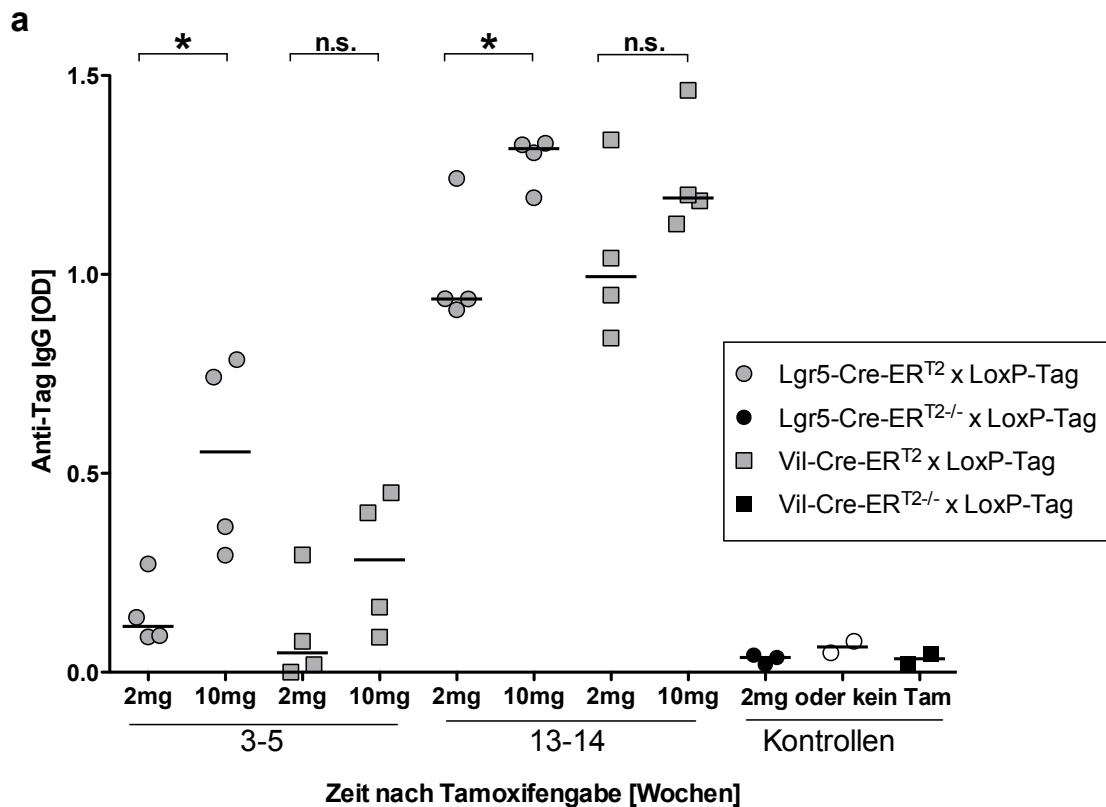
Mit Hilfe eines SV40 anti-Tag ELISA (Abbildung 4.4 b und c) wurde die spezifische Antikörperantwort nach Tamoxifengabe in beiden Mausstämmen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Wir zeigten, dass beide Mausstämme einen ähnlich hohen Antikörpertiter entwickelten. Ab circa einem Monat nach Tamoxifen waren anti-Tag IgG in beiden Mausstämmen nachweisbar und erreichten acht bis neun Monate nach Tamoxifen ein Plateau.

Dabei war die Menge des Tamoxifens in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen der entscheidende Faktor für die Menge der produzierten Antikörper. Bei Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen handelte es sich um den Effekt nach Erreichen eines Schwellenwertes. Sobald Tamoxifen gegeben wurde, unabhängig davon ob 2 mg oder 10 mg, wurden Tag-spezifische IgG produziert (Abbildung 4.5 a). Vermutlich weil bei einer einmaligen Tamoxifengabe bereits genügend Zellen rekombinierten und Tag-Protein exprimierten. Bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen hingegen handelte es sich um einen kumulativen Effekt: je mehr Tamoxifen gegeben wurde, desto mehr Tag-IgG wurde produziert.

Dieser Fakt spiegelt sich ebenso in der Histologie wider: *Zhu Y. et al., 2013* zeigte, dass SV40 Tag-Zellen durch die Gabe von Tamoxifen in Apoptose gehen [116], jedoch ließen sich bei einer nur einmaligen Gabe von Tamoxifen in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen keine Tag-positiven Enterozyten oder Kolonozyten in den Krypten nachweisen. Ergebnisse aus dem LIFE-Bericht des Universitätsklinikum München deuten daraufhin, dass Lgr5-Expression durch SV40 Tag unterdrückt wird [117]. In Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen war die Anzahl der Tag-positiven Krypten bei einmaliger Gabe von Tamoxifen (Abbildung 4.5 b) ähnlich hoch wie bei fünfmaliger Gabe (Vgl. Abbildung 4.8 c). Die Zahl der Tag-positiven Zellen war im Dünndarm größer als im Kolon, was schließlich daran liegt, dass im Dünndarm nicht nur Krypten sondern auch Zotten vorkommen und daher dort vielfach mehr rekombinationsfähige Zellen vorhanden sind.

Abbildung 4.5: In Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag ist eine Aktivierung mit Tamoxifen oberhalb einer Schwelle zur Tag-Expression notwendig. **a** Die Antikörpermenge wurde mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Alle Proben wurden auf einer 96 Well-Platte gemessen. Nur bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag war ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen 2 mg und 10 mg appliziertem Tamoxifen erkennbar. **b** Es wurden fünf „High Power Fields“ (HPF) pro Maus ausgezählt. **c** Abgebildet sind Ausschnitte aus Dünn- und Dickdarm von Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag und Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag.

Die Menge von Tamoxifen beeinflusst direkt die Menge anti-Tag-spezifischer IgG in Lgr5-CreER^{T2} x LoxP-Tag Mäusen



In Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag (n = 5) waren keine Tag-positiven Zellen im Darm detektierbar.

4.2.3 Präsumptiv geringere Rekombinationsfrequenz in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen als in Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen unter Nutzung der Rosa26-RFP-Reportermaus

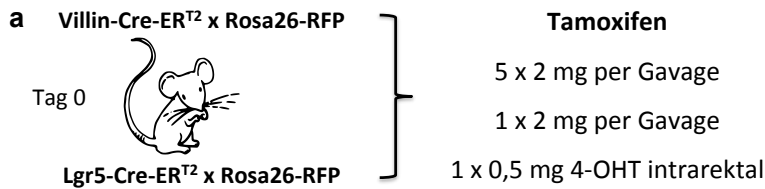
Für sogenannte Tracing-Experimente wurden Lgr5-Cre-ER^{T2}- und Vil-Cre-ER^{T2}-Tiere mit Rosa26-RFP-Reportermausen verpaart, welche das Tandem-Dimer rote Fluoreszenzprotein (tdRFP) unter dem ubiquitären Rosa26-Lokus exprimieren [118]. Es wurde die Rekombination in beiden Mausstämmen nach Tamoxifengabe untersucht (Abbildung 4.6 a und b). Dabei zeigte sich, dass die fünfmalige Gabe von Tamoxifen in Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP nach zwei bis drei Wochen zu einer Rekombinationsrate von 50 - 60 % ($n = 4$) von allen Epithelzellen führte. Dieser Effekt persistierte drei bis vier Monate nach Tamoxifengabe (15 - 40 %, $n = 4$). Die einmalige Gabe beziehungsweise die Gabe der aktiven Form, 4-Hydroxytamoxifen, führte zu einer weitaus geringeren Rekombination unter den Epithelzellen mit 5 % ($n = 2$) nach zwei bis drei Wochen beziehungsweise 0,5 % ($n = 2$) für die aktive Form.

Für Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP wurde mit 10 mg eine Rekombination von circa 5 % ($n = 4$) nach zwei bis drei Wochen erreicht. Diese Rekombination erfolgte in den Stammzellen, welche durch GFP ebenfalls gemessen wurden. RFP kennzeichnet in dem Zusammenhang die Stammzellen und alle nachfolgenden Zellen, d.h. Transit Amplifying-Zellen, Enterozyten, etc. Die Rekombination persistierte über die Zeit.

Durch einmalige Gabe von Tamoxifen konnte, analog zu den Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mäusen, ebenfalls nur eine geringere Rekombination von 1 % ($n = 3$) nach zwei bis drei Wochen erreicht werden. 4-Hydroxytamoxifen führte in Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP nur zu einer Rekombination von circa 0,1 bis 0,5 % ($n = 2$) bezogen auf alle epithelialen Zellen.

In allen Experimenten war die Rekombination im Dünndarm höher als im Kolon (hier nicht dargestellt), was zum einen an einer geringeren Zahl isolierter Zellen liegen kann und zum anderen wiederum durch eine geringere Zahl von Kolonozyten im Vergleich mit Enterozyten liegen mag. Ebenso werden im Dickdarm mehr tote Zellen abgeschilfert und ausgeschieden als im Dünndarm.

Anhand der Ergebnisse aus diesem Versuch kann eine ungefähre quantitative Abschätzung in Bezug auf die Zahl der rekombinierten Zellen in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag und Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag erfolgen. Wobei dabei nicht der Selektions- und Wachstumsvorteil der Zellen berücksichtigt wird, die SV40 Tag exprimieren.



Zeit nach Tam	Lgr5-Cre-ERT2 x Rosa26-RFP			Vil-Cre-ERT2 x Rosa26-RFP		
	10 mg	2 mg	4-OHT	10 mg	2 mg	4-OHT
2 - 3 Wochen	5 % (n = 4)	1 % (n = 3)	0,1 - 0,5 % (n = 2)	50 - 60 % (n = 4)	5 % (n = 2)	0,5 % (n = 2)
7 - 8 Wochen	2 - 6 % (n = 2)	0 - 0,5 % (n = 1)	0,02 - 0,3 % (n = 1)	15 - 40 % (n = 4)	0,5 - 5 % (n = 1)	0,4 - 1,5 % (n = 1)
3 - 4 Monate	1,5 - 3 % (n = 3)	0,2 - 3 % (n = 2)	0 - 0,14 % (n = 1)	15 - 40 % (n = 4)	10 % (n = 2)	0,02 - 0,1 % (n = 1)

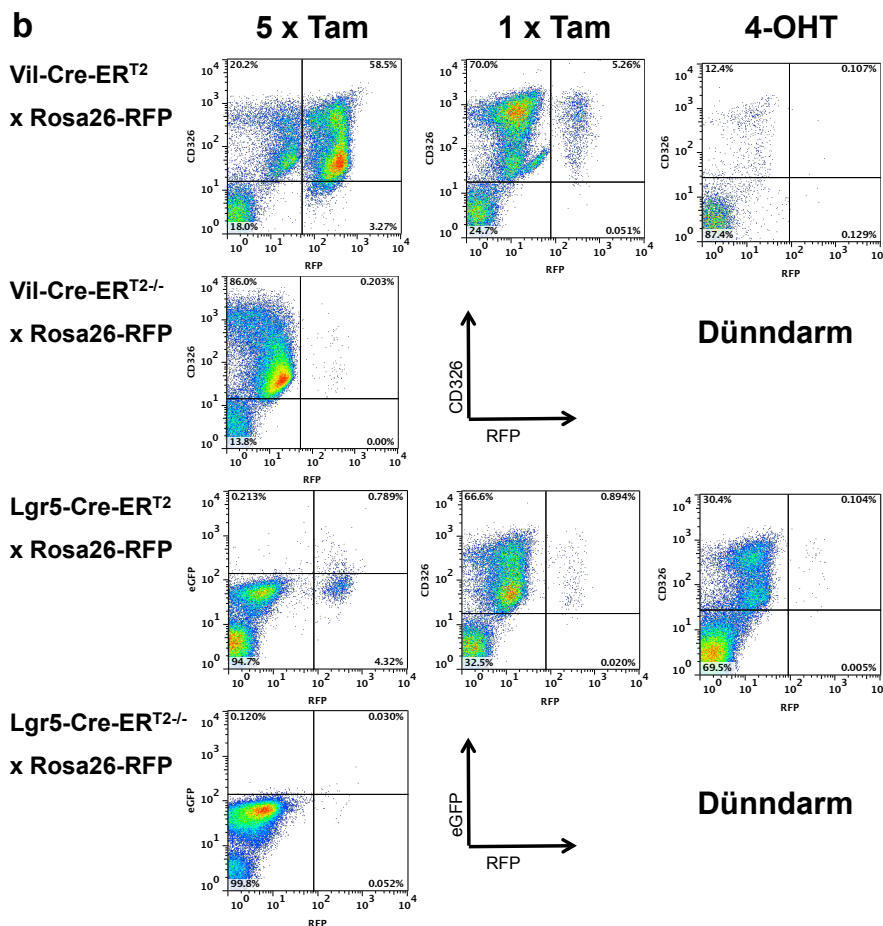


Abbildung 4.6: Die Rekombinationsfrequenz ist in Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP höher als in Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mäusen. **a** Schematische Darstellung der verschiedenen Behandlungsarten. In der Tabelle sind die Daten der unabhängig durchgeführten Experimente ($n > 3$) aufgelistet. Der Prozentsatz bezeichnet CD45⁺CD326⁺RFP⁺ Zellen im Dünndarm nach durchflusszytometrischer Messung. **b** Ein FACS-Plot als Beispiel für jede Behandlungsart und Gruppe ist dargestellt. Die Messung wurde eine Woche nach Tamoxifengabe durchgeführt. Links unten: beispielhafte Abbildung der CD45⁺eGFP⁺RFP⁺ Zellen, respektive Lgr5⁺ Stammzellen (GFP high) und TA-Zellen (GFP low).

4.2.4 Verzögerte Tumorentwicklung und damit einhergehend längeres Überleben in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen im Vergleich zu Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen

Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifen hatten eine durchschnittliche Lebenserwartung von 18 Monaten ($n = 11$) bis sie an Tumoren im Darm ($n = 3$) und Pankreas ($n = 1$), in der Niere ($n = 5$) oder Leber ($n = 6$) verstarben (Abbildung 4.7 a). Dabei hatten einige Tiere multiple Karzinome ausgebildet. Durch die Gabe von Tamoxifen verkürzte sich diese Lebenserwartung auf 11 Monate ($n = 10$) im Durchschnitt. Die Tumorentwicklung fand dann überwiegend im Darm statt ($n = 8$).

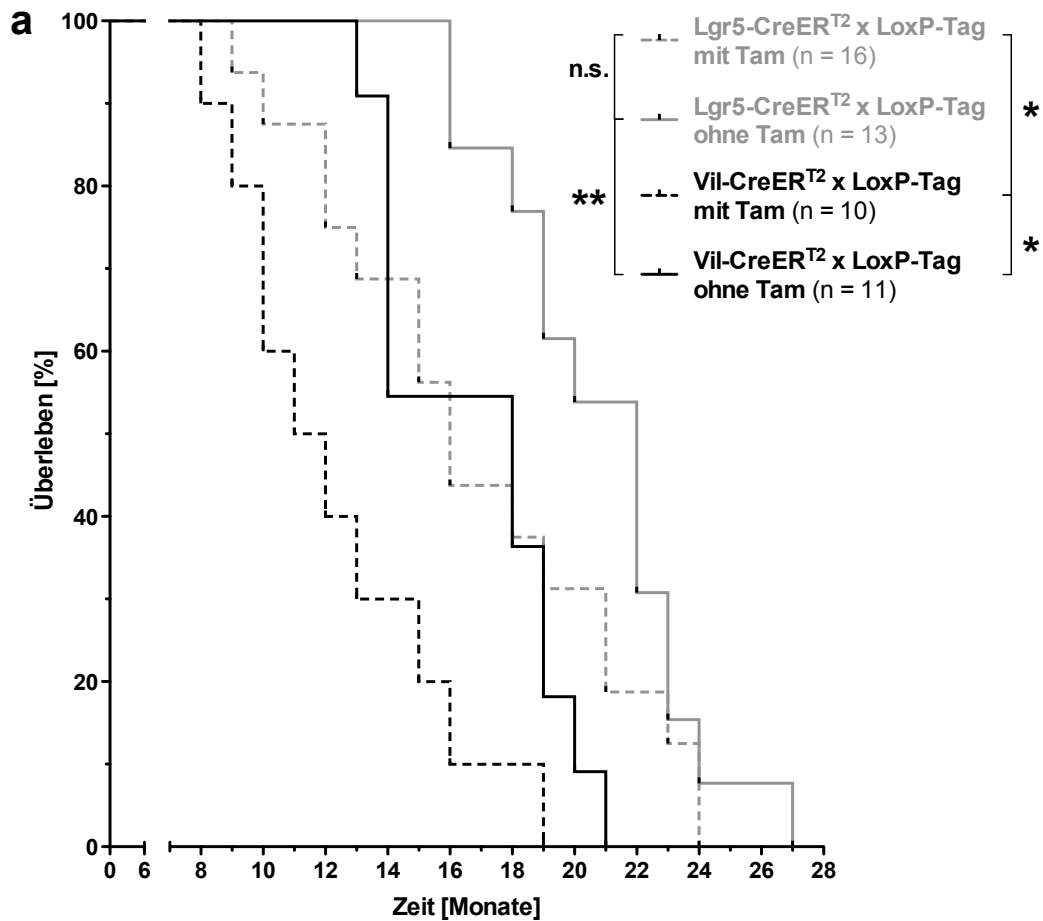
Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifenverabreichung hatten eine durchschnittliche Lebenserwartung von 23 Monaten ($n = 13$) mit einer Tumorentwicklung vorwiegend in Niere ($n = 5$), Leber ($n = 3$) und Pankreas ($n = 3$). Durch die Gabe von Tamoxifen entwickelten die Mäuse früher Tumoren im gastro-intestinalen Trakt, vor allem im Darm ($n = 8$), in der Leber ($n = 7$), im Magen ($n = 6$) und im Pankreas ($n = 5$). Es konnten mehrfach multiple Karzinome makroskopisch nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Lebenserwartung verkürzte sich auf 16 Monate ($n = 16$).

Um zu überprüfen, ob in den Tumoren tatsächlich Rekombination stattgefunden hatte, wurde mit Hilfe der Cre-/LoxP-Rekombinations-PCR die 114 Basenpaare lange Bande amplifiziert (Abbildung 4.7 b).

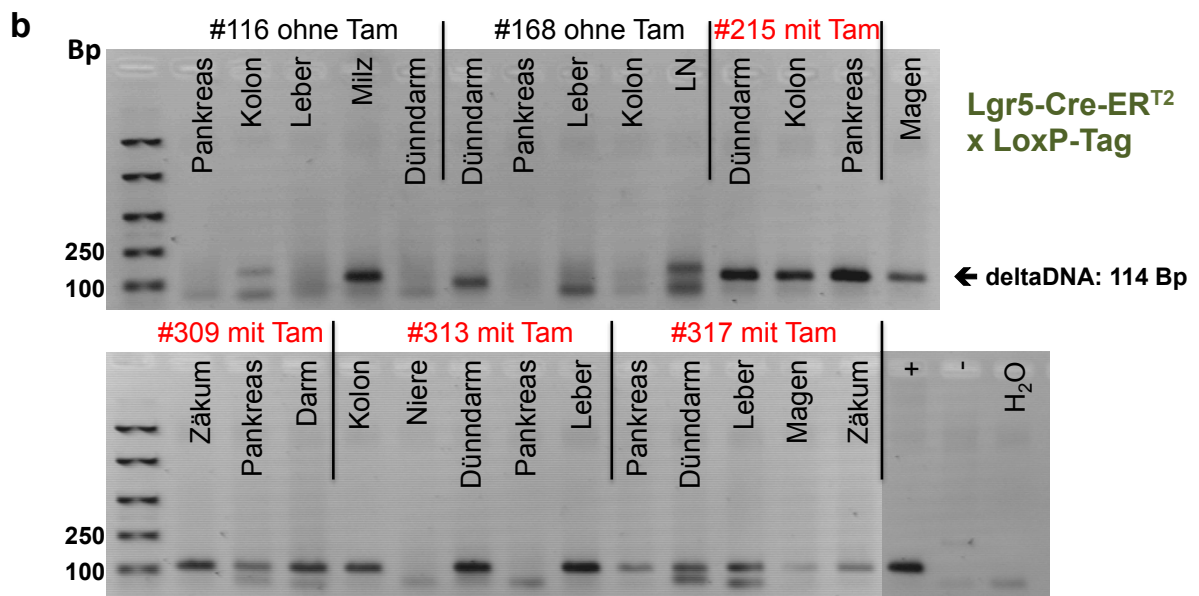
Die Tumoren wurden histologisch mit einem SV40-Antikörper angefärbt. Mikroskopisch zeigte sich, dass bei den beiden Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen #116 und #168 ohne Tamoxifen nur der Milztumor positiv für SV40 Tag war und nur in dem Milztumor Rekombination stattgefunden hatte.

In den anderen Tumoren von vier Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen mit Tamoxifen (#215, #309, #313, #317) zeigten mit Ausnahme eines Pankreastumors nur die histologisch Tag-positiven Tumoren ebenso eine Rekombinationsbande (Abbildung 4.7 c).

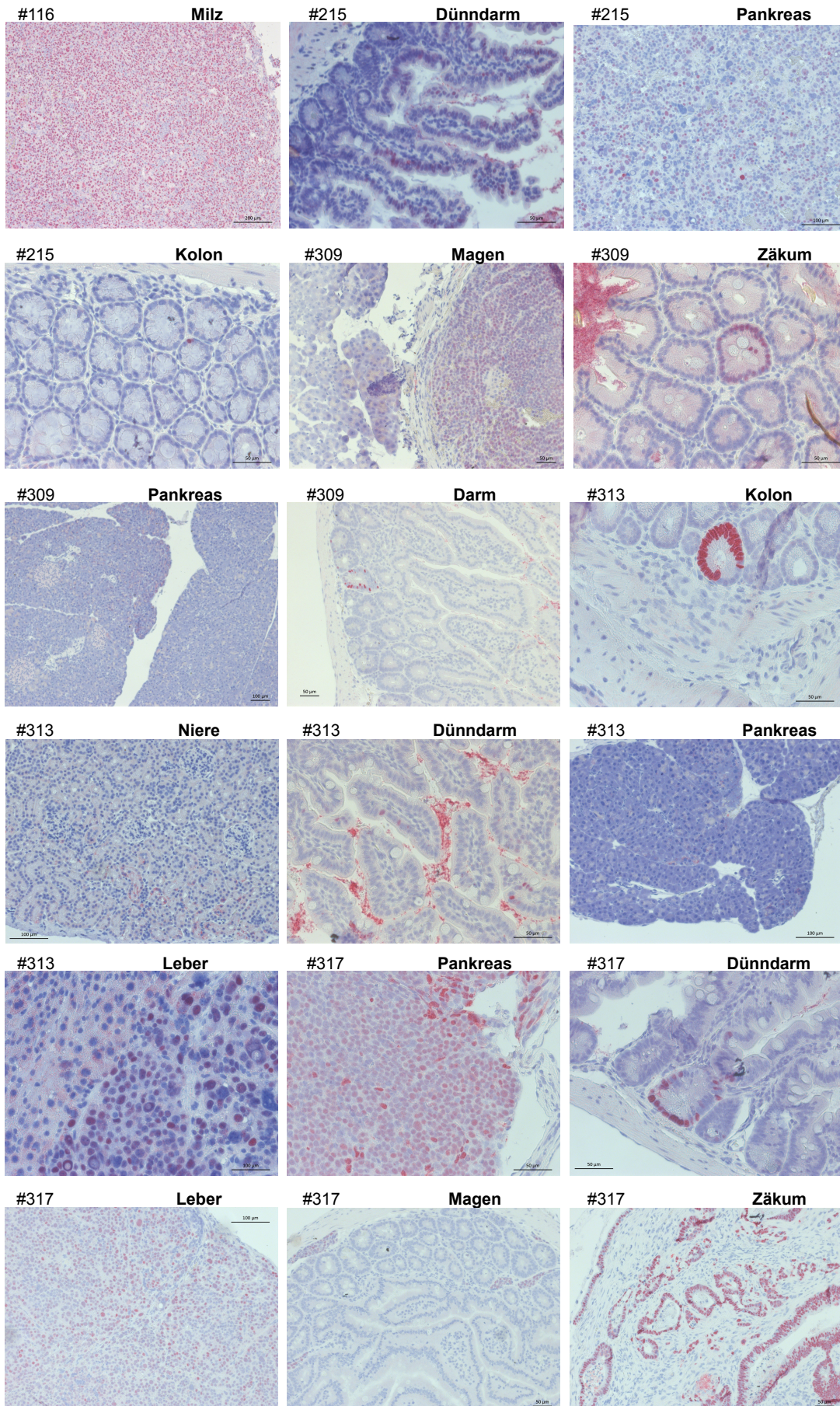
Abbildung 4.7: Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag leben länger als Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag sowohl mit als auch ohne Applikation von Tamoxifen. **a** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier. Eine Auflistung der nach Nekropsie gefundenen Tumoren befindet sich darunter in Tabellenform. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**). **b** Eine Untersuchung der Cre-/LoxP-Rekombination wurde bei einigen Tieren anhand von einer PCR mit DNA aus FFPE-Gewebe vollzogen. **c** Die Tumoren wurden histologisch auf Tag untersucht. Tag-positive Zellen sind hier mit rot angefärbtem Zellkern zu sehen.



Tumor-lokalisierung	Lgr5-CreER ^{T2} x LoxP-Tag	Vil-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag	Lgr5-CreER ^{T2} x LoxP-Tag	Vil-Cre-ER ^{T2} x LoxP-Tag
	mit Tamoxifen		ohne Tamoxifen	
Pancreas	n = 5	n = 0	n = 3	n = 1
Magen	n = 6	n = 0	n = 1	n = 0
Darm	n = 8	n = 8	n = 2	n = 3
Niere	n = 3	n = 1	n = 5	n = 5
Leber	n = 7	n = 3	n = 3	n = 6



C Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag



4.2.5 Eliminierung der Tag-positiven Zellen durch reaktive CD8⁺ T-Zellen nach Tamoxifengabe in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen

Entgegen der Annahme, dass die gerichtete Expression eines Tumorantigens in der Stammzelle des gastrointestinalen Traktes zu einer effizienteren Tumorigenese führt, ist die Latenz der Tumorentwicklung in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag länger als in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen. Ein Grund dafür könnte beispielsweise eine spezifische Immunantwort gegen SV40 Tag sein.

Deshalb haben wir in *In vivo* Kill-Assays die spezifische CD8⁺ T-Zellantwort gegen das dominante Tag-Epitop Peptid IV untersucht. Es stellte sich heraus, dass die alleinige Gabe von Tamoxifen in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag, nicht aber in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag, für eine spezifische Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten sorgte (siehe Abbildung 4.8 a).

Um diese Immunantwort genauer zu untersuchen, haben wir in einem ersten Versuch die Zahl der Tag⁺- und CD3⁺-Zellen in beiden Mausstämmen nach einer Woche nach Tamoxifengabe untersucht und miteinander verglichen (Abbildung 4.8 b).

Dabei zeigte sich, dass die histologisch nachweisbare Tag-Expression in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen viel geringer ist als in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen. In Bezug auf die Anzahl der T-Zellen zeigte sich in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tieren ($n = 4$) kein Unterschied zur Wildtypmaus ($n = 1$). Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag wiesen bereits eine Woche nach Tamoxifenapplikation sehr viele Tag-positive Zellen und sogar ganze Krypten ($n = 4$) auf. Es waren mehr T-Zellen im Dünndarm als im Dickdarm detektierbar und es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zur Wildtypmaus ($n = 1$).

In einem nächsten Versuch haben wir die T-Zellen in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen mit Hilfe eines Thy 1.2-Antikörpers depletiert und daraufhin fünf Mal Tamoxifen verabreicht um anschließend eine Woche später die Anzahl Tag-positiver Zellen in der Histologie zu untersuchen (Schema 4.8 d).

Dabei stellte sich heraus, dass sobald T-Zellen depletiert waren, auch in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen sehr früh Tag-positive Zellen auftraten. Dieser Unterschied war im Kolon noch deutlicher sichtbar als im Dünndarm (Abbildung 4.8 c und e).

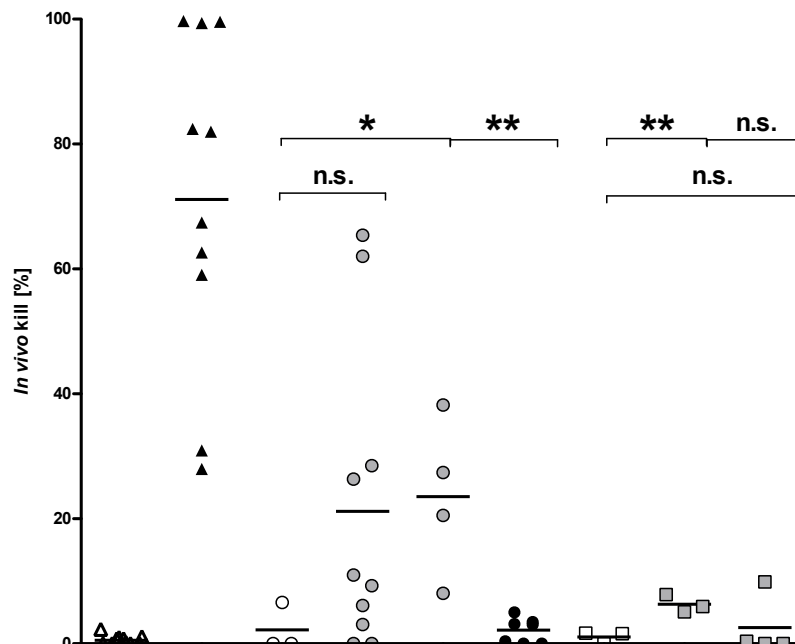
Dies deutet darauf hin, dass insbesondere die T-Zellen nach Tamoxifengabe eine Tag-Expression im Darm in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Tieren verhindern. Um diese Hypothese weiter zu untermauern haben wir die intraepithelialen T-Lymphozyten aus dem Darm nach Aktivierungsmarkern untersucht.

Es zeigte sich, dass insbesondere eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen (nicht notwendigerweise Tag-spezifisch) aber auch von CD4⁺ T-Zellen sechs Tage nach der letzten Tamoxifengabe mit Hochregulation von CD44 und CD69 zu beobachten war (Abbildung 4.8 f und g).

Abbildung 4.8: Die Tamoxifengabe könnte in Lgr5-Cre-ER¹² x LoxP-Tag zu einer T-Zell-Aktivierung führen, die eine Tag-Expression verhindert. **a** Es sind vier unabhängig durchgeführte *In vivo* Kill-Assays zusammengefasst dargestellt. Informationen über Genotyp, Immunisierung, Tamoxifengabe, Alter und Anzahl der Mäuse pro Gruppe sind in der Tabelle ersichtlich. **b** Es wurden fünf HPFs pro Maus ausgezählt. Die Kontrollen (diagonal gestreifte Balken) zeigten in der Tag-Färbung keine positiven Zellen, weshalb hier nur n.d. vermerkt ist. **c** Eine Woche nach T-Zell-Depletion mit 30H12-Antikörpern oder seinem Isotypen LTF-2 wurden fünf HPFs pro Maus ausgezählt. **d** Schematische Darstellung der Applikation der verschiedenen Antikörper und von Tamoxifen. **e** Es sind Beispiele für CD3- oder Tag-Färbungen nach 30H12- oder LTF-2-Behandlung abgebildet. **f** Exemplarische FACS-Plots der CD44- und CD69-Färbung als Aktivierungsmarker für T-Zellen im Dünndarm (Analyse der 7-AAD⁺CD3⁺CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf Expression von CD69 und CD44).

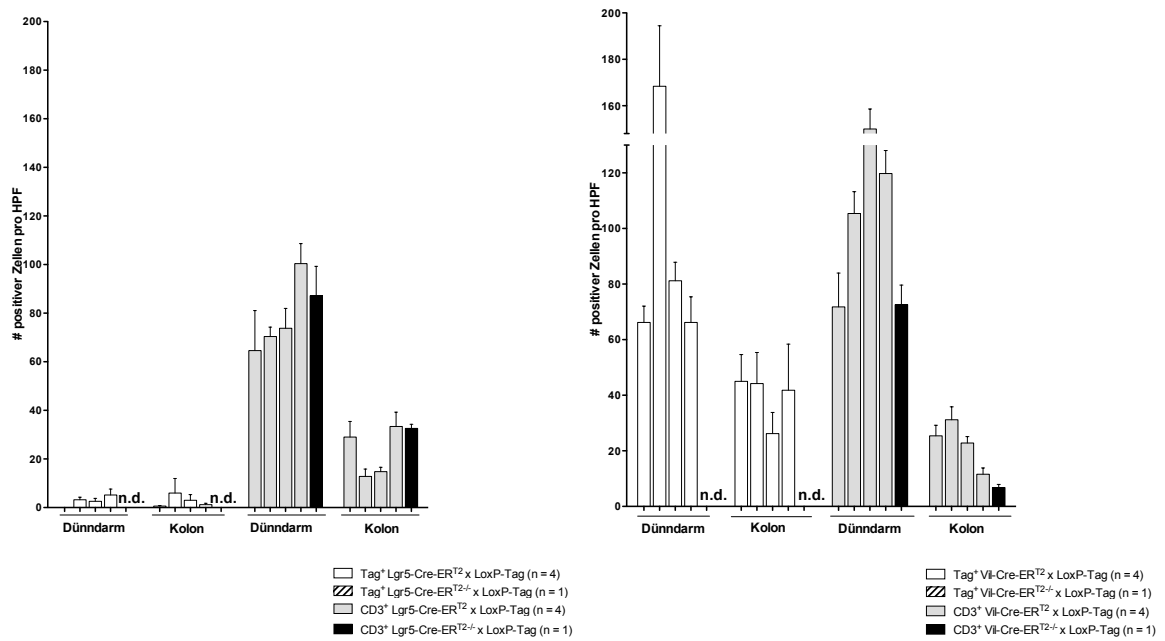
Induktion einer spezifischen ZTL-Aktivität durch Gabe von Tamoxifen in Lgr5-CreER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen

a

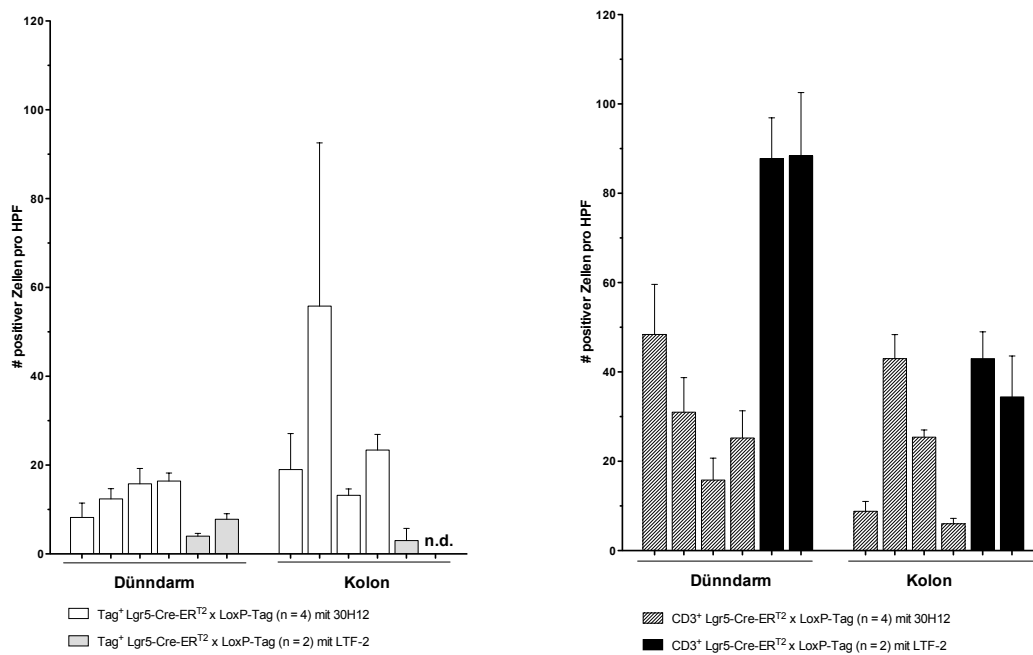


Mausstamm	B6	B6	Lgr5-CreER ^{T2} x LoxP-Tag		LoxP-Tag	Vil-CreER ^{T2} x LoxP-Tag		
Immunisierung mit 16.113	-	+	-	-	-	-	-	-
Tamoxifen (Zeit nach Gabe)	-	-	-	+	+	+	-	+
				(1 Wo)	(8 Mo)	(1Wo)		(1 Wo)
Anzahl der Mäuse	11	10	3	10	4	7	3	3
Alter [Monate]	2-3	2-3	5	2	7	2	2	8

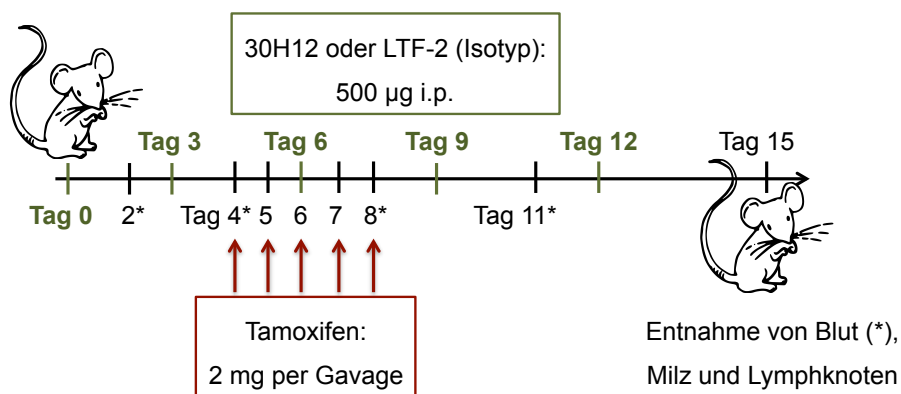
b



c



d Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag

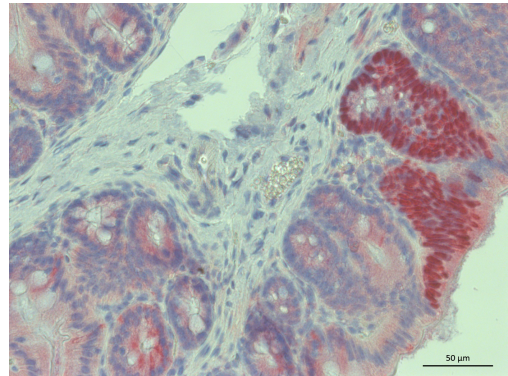
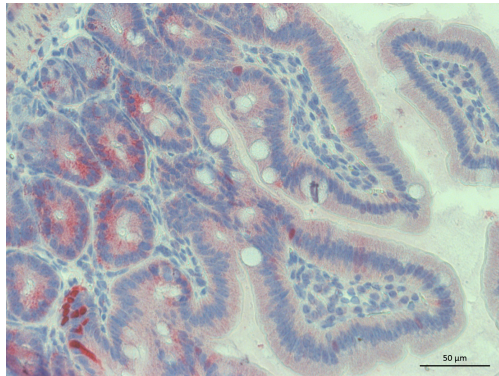


e T-Ag

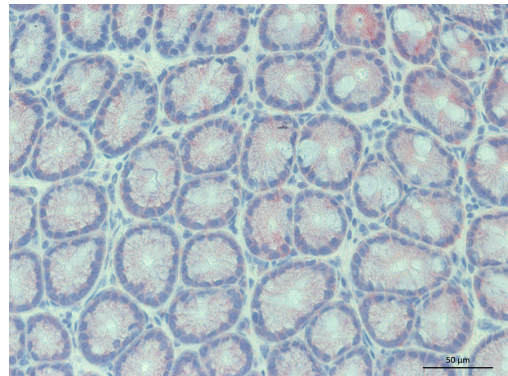
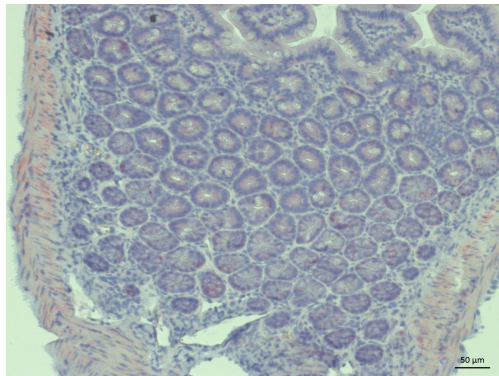
Dünndarm

Kolon

**Lgr5-Cre-ER^{T2}
x LoxP-Tag
859
30H12**



**Lgr-Cre-ER^{T2}
x LoxP-Tag
867
LTF-2**

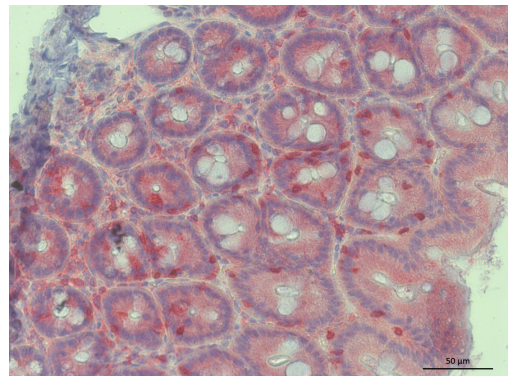
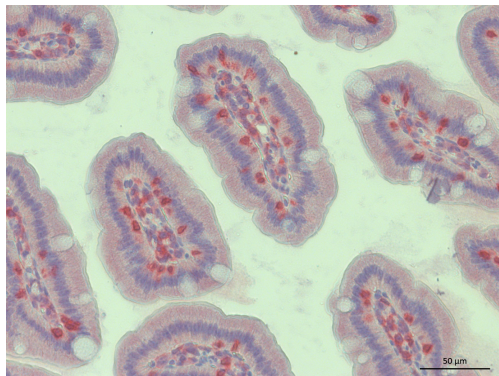


CD3

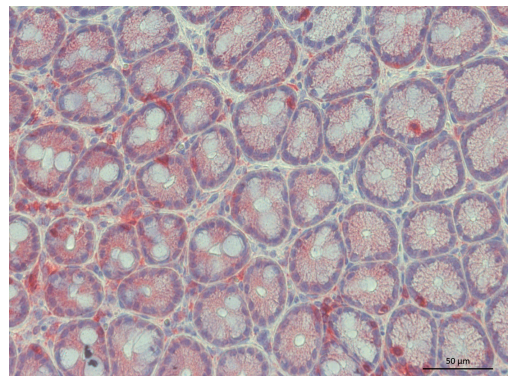
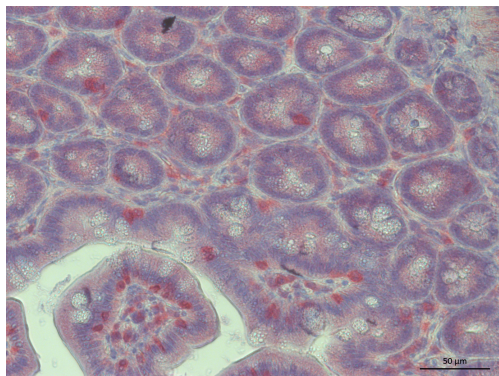
Dünndarm

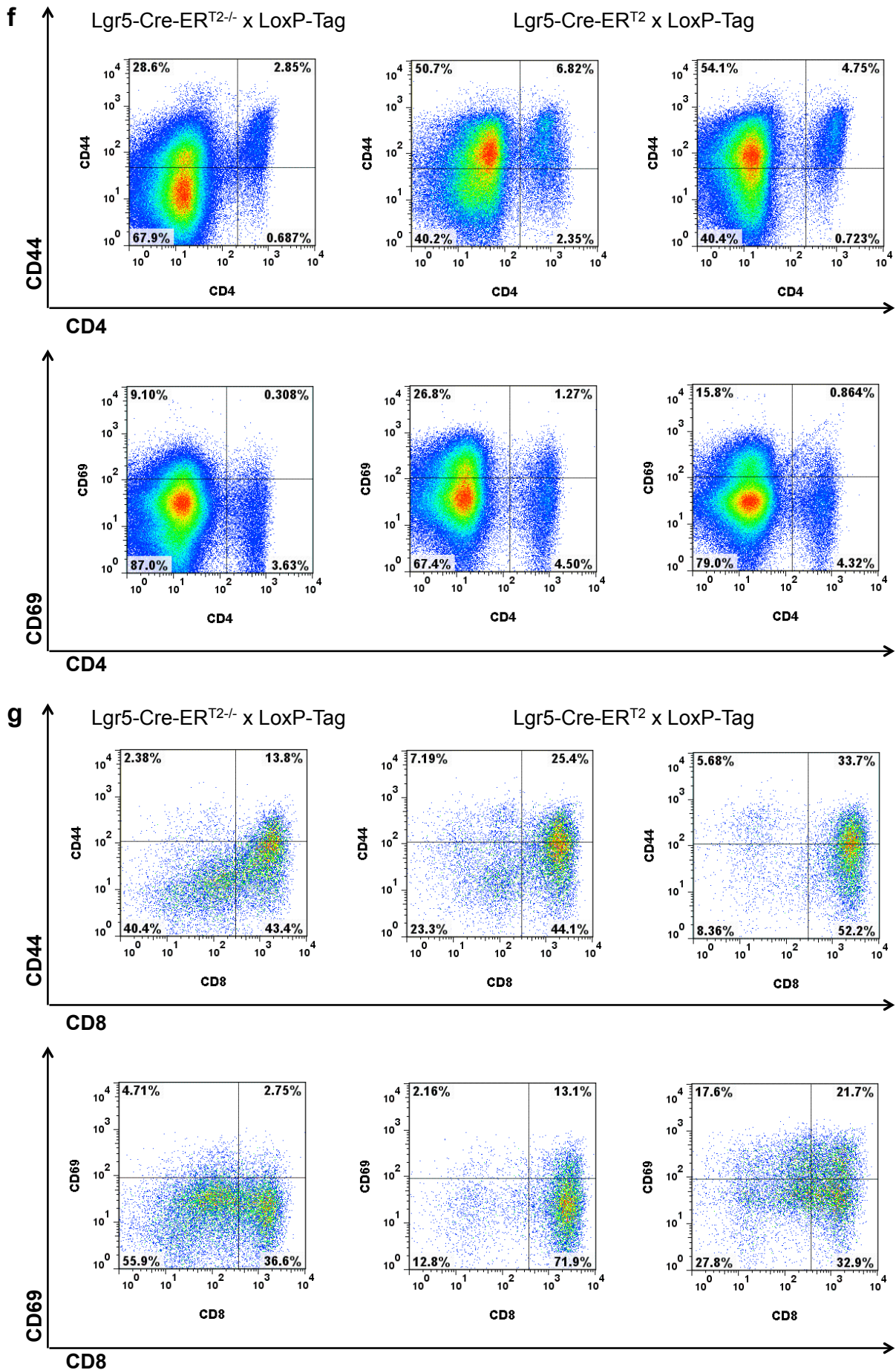
Kolon

**Lgr5-Cre-ER^{T2}
x LoxP-Tag
859
30H12**



**Lgr-Cre-ER^{T2}
x LoxP-Tag
867
LTF-2**





5. DISKUSSION

5.1 Neue Erkenntnisse aus diesen Tumormodellen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Mausmodelle beschrieben, die aufgrund der Tag-Expression in den Epithelzellen des Darmes die Analyse der Immunantwort gegen das kolorektale Karzinom ermöglichen.

Entgegen der Annahme, dass eine Onkogenexpression in der Stammzelle zu einer schnelleren und effizienteren Tumorigenese [35] führt als die Expression in den weiter differenzierten epithelialen Zellen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Tumorentstehung unter anderem durch die Beteiligung von T-Zellen erfolgt sein könnte. Dabei spielen sowohl das CD4⁺ T-Zell-Kompartiment, die den Klassenwechsel der B-Zellen initiieren, als auch die CD8⁺ T-Lymphozyten eine wichtige Rolle.

Ein weiterer Aspekt der ineffizienten Tumorentstehung in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen könnte der durch die Tamoxifenverabreichung bedingte Zytokinsturm und möglicherweise Apoptoseinduktion sein, welche zu einem Verlust der Lgr5-exprimierenden Stammzellen führen [116] könnte.

Während bei Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen nach einigen Wochen Latenz immer eine ganze Krypte Tag-positiv wurde, waren bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag nur einzelne Zellen innerhalb einer Krypte Tag-positiv. Dies spricht insbesondere für einen Wachstumsvorteil der Tag-positiven Zellen innerhalb einer Krypte und lässt eine ursprüngliche Monoklonalität der Krypten sehr unwahrscheinlich erscheinen.

5.1.1 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifengabe entwickeln selten mikroskopisch Tag-positive Darmläsionen oder Darmtumoren

In der hier zu Grunde liegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden insgesamt 25 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-transgene Tiere, in einem Alter von mehr als 17 Monaten untersucht. Dabei wurden makroskopisch zwei Darmtumoren identifiziert, von denen nur ein einziger Tag-positiv war. Im Vergleich dazu wurden 17 Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse der gleichen Altersgruppe untersucht und innerhalb dieser Entität zehn Tag-positive Darmläsionen identifiziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Lgr5-

Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen die Cre-Rekombinase sehr selten ohne Tamoxifenapplikation aktiviert wird, sodass die selten stattfindende Rekombination zur Apoptoseinduktion in den Tag-exprimierenden Lgr5-positiven Stammzellen führt. Das dadurch freigesetzte Antigen wird durch das Immunsystem erkannt und eine Tumorentwicklung so verhindert. Zudem ist die Onkogenexpression, gemessen an den Versuchen mit Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP, wahrscheinlich sehr gering. Die Toleranzentwicklung des CD8⁺ T-Zell-Kompartiments erfolgt in diesem Mausmodell aufgrund einer geringeren Antigenmenge sehr viel später als bei Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag. Der bereits nach fünf Monaten nachweisbare IgG-Antikörpertiter spricht dennoch für eine Antigenexpression und Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen in der Maus. Es könnte sein, dass Tag noch in anderen Zellen außerhalb des Darms zu einem geringen Teil exprimiert wird, da Lgr5 auch in anderen Organen wie dem Magen, dem Pankreas und der Leber vorkommt. Der Darm hat einen hohen Anteil proliferierender Zellen. Wenn eine Stammzelle getroffen würde, müsste eine Tumorentwicklung sehr viel schneller ablaufen und eine halbe oder ganze Krypte Tag-positiv sein.

Eventuell spielen auch andere Mechanismen wie beispielsweise eine Interleukin-22-Protektion der Stammzellnische eine Rolle. Die RORγt⁺ Lymphozyten des angeborenen Immunsystems (ILCs), die in intestinalen Kryptenpatches und Lymphfollikeln lokalisiert sind, produzieren IL-22 und induzieren damit ein Genexpressionsprogramm in Paneth- und Stammzellen, welches sie vor verschiedensten Schädigungen, wie beispielsweise eine SV40-Onkogenexpression in den Stammzellen, schützen könnte [119].

Das sehr seltene sporadische Auftreten von Darmtumoren in diesem Tiermodell reflektiert dennoch sehr gut die Situation beim Menschen.

5.1.2 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse ohne Tamoxifenapplikation zeigen eine vergleichbare Toleranzentwicklung im CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Kompartiment

Die Toleranzentwicklung in beiden Mausstämmen ohne Tamoxifengabe verlief grundsätzlich ähnlich mit dem einzigen Unterschied, dass CD8⁺ T-Zell-Toleranz in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen sehr viel später und anti-Tag IgG sehr viel früher auftraten (siehe nachfolgende Abbildung).

Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag wiesen bereits ab einem Alter von sechs Monaten nur noch eine ZTL-Aktivität von circa 20 % auf und erst ab einem Alter von acht bis neun Monaten waren in 2/4 Mäusen anti-Tag IgG nachweisbar [114].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SV40 Tag in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag zu einem geringen Ausmaß schon recht früh exprimiert wird und die Tag-Expression eine Art Immunisierungseffekt aufweist. In Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag dauert die anti-SV40

Antikörperentwicklung länger, da die differenzierten Zellen sehr schnell proliferieren und ein Villus nur eine Lebensdauer von circa drei Tagen aufweist. Die sporadische Expression von Tag und die dadurch hervorgerufene Antigenmenge sind nur von kurzer Dauer, da die Wahrscheinlichkeit, dass eine Stammzelle getroffen wurde, die dauerhaft Tag exprimieren würde, sehr

viel geringer ist. Dementsprechend gibt es erst durch eine zeitliche Akkumulation genügend Antigen für eine Antikörperbildung. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Modell ein bestimmter Schwellenwert für die anti-Tag spezifische IgG-Produktion erreicht werden muss.

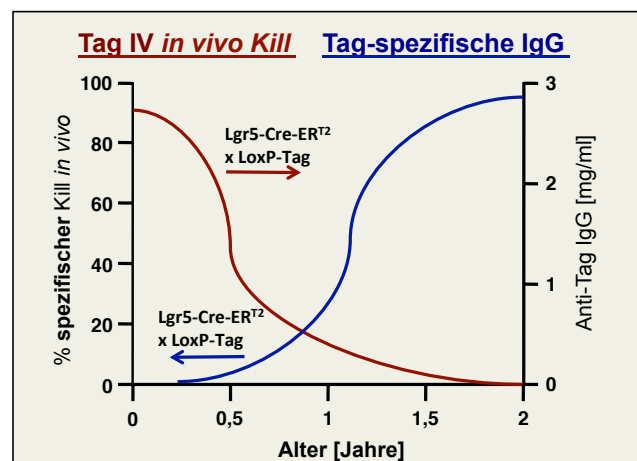
Anders wiederum verhält es sich mit den ZTL: durch die frühe Expression von SV40 Tag in einer größeren Zellzahl als in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag geht der Immunisierungseffekt schneller verloren und die CD8⁺ T-Zellen werden früher tolerant.

5.1.3 Die Tamoxifenapplikation führt bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen zu einer erhöhten Tumorzinzidenz im Vergleich zur nicht induzierten Tag-Expression

Nach Tamoxifengabe haben 8/16 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse Darmtumore entwickelt (Tag-positiv $n = 7$; ungefärbt $n = 1$). Im Vergleich dazu haben 8/10 Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse einen Tumor im Dünndarm und/oder Dickdarm entwickelt (Tag-positiv $n = 4$, Tag-negativ $n = 1$, ungefärbt $n = 3$).

Des Weiteren wurden andere Tumore wie pankreatische Läsionen, Leber-, Magen- und Nierentumoren beobachtet die ebenso Tag exprimieren können. Embryologisch

„Split tolerance“ in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag



betrachtet ist eine Lgr5-Expression in diesen Organen ersichtlich, da sich das Darmrohr aus dem Endoderm differenziert. Danach folgt die Abtrennung zwischen Darmrohr und Dickdarm. Aus dem Darmrohr entwickeln sich dann der Magen, Dünndarm, die Leber und das Pankreas. Entwicklungsgeschichtlich ist es somit natürlich, dass Lgr5-Stammzellen nicht nur im Dünn- und Dickdarm vorkommen sondern ebenso in Leber, Magen und Pankreas.

Eine Entwicklung von Hautläsionen oder ovariellen Tumoren wurde in dem oben genannten Mausmodell nie beobachtet. Da Tamoxifen immer über die Schlündelsonde direkt in den gastrointestinalen Trakt verabreicht wurde, kann es sein, dass die Tamoxifenkonzentration im Körper zu einer Aktivierung von Lgr5 in den Haarfollikeln [62] nicht ausreichte. Das gleiche gilt für das Ovar [71].

Sehr selten wurden Augenprobleme (klinisch ähnlich dem grauen Star oder Verklebungen) bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen bereits in einem jungen Alter beobachtet. Diese Tatsache beruht am wahrscheinlichsten auf dem genetischen LoxP-Tag-Hintergrund, da diese Mäuse noch kein Tamoxifen zur Aktivierung von SV40 Tag erhalten hatten.

5.1.4 Nachweis einer effizienteren Rekombinationsfrequenz in Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen im Vergleich zur Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Maus mit Hilfe der Rosa26-RFP-Indikatormaus

Anhand der Verpaarung von Vil-Cre-ER^{T2}- und Lgr5-Cre-ER^{T2}- Mäusen mit Rosa26-RFP-Indikatormäusen konnte eine quantitative Analyse der rekombinierten Zellen nach Tamoxifenverabreichung erfolgen. Das Ergebnis demonstriert recht deutlich, dass die Rekombination in Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP fast zehn Mal so stark ist im Vergleich zu jungen Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mäusen zwei bis drei Wochen nach fünfmaliger Tamoxifengabe. Die Erklärung dafür liegt in dem Aufbau des Darmes und den unterschiedlichen Zielstrukturen beider Mausmodelle.

Während in Vil-Cre-ER^{T2}-Mäusen durch Tamoxifengabe nicht nur die Stammzelle sondern auch die TA-Zellen und alle differenzierten epithelialen Zellen rekombinieren können, erfolgt bei Lgr5-Cre-ER^{T2}-transgenen Mäusen die Rekombination allein in den Stammzellen und in einigen wenigen TA-Zellen, welche die Lgr5-Expression im Laufe ihrer Entwicklung allerdings verlieren. Dies führt dazu, dass das Ergebnis einzig durch den quantitativen Aspekt bestätigt werden kann. Das gleiche gilt für das

Verteilungsverhältnis zwischen Dünn- und Dickdarm. Da im Dickdarm keine Villi vorhanden sind, ist dort nur eine Rekombination von weniger Zellen als im Dünndarm möglich. Dieser Fakt spiegelt sich vor allem im Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mausmodell wider. Ein weiterer Hinweis auf den physiologischen Sachverhalt ist, dass die Menge der rekombinierten Zellen im Vil-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mausmodell über die Zeit bedingt durch die hohe Apoptoserate sehr stark abnahm. Im Vergleich dazu persistierte die Zahl der Rekombinationen in den Lgr5-Cre-ER^{T2} x Rosa26-RFP-Mäusen nach Tamoxifengabe über die Zeit.

Diese Beobachtungen berücksichtigen nicht den Fakt des Wachstums- und Überlebensvorteils, den die SV40 Tag transformierten Zellen wahrscheinlich haben. Unter Beachtung dieses Aspektes ist davon auszugehen, dass Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag leichter und schneller Darmtumore entwickeln als Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag, da eine größere Zahl von Zellen transformiert wird und diese nicht wie im Rosa26-RFP-Modell in Apoptose gehen, sondern einen Selektionsvorteil gegenüber den nicht-transformierten Zellen haben.

5.1.5 Unabhängig von der Induktion der Tag-Expression durch Tamoxifen zeigen Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse eine längere Latenz der Tumorentwicklung als Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse

Der längeren Latenz der Tumorentstehung in Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen könnten zwei Mechanismen zugrunde liegen: zum einen werden bei Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag mehr Zellen durch Tamoxifengabe transformiert; zum anderen könnte bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag transgenen Mäusen die SV40 Tag-Expression in der entzündlichen Umgebung des Kolons durch T-Zellen erkannt und teilweise zerstört werden (sog. Immunosurveillance) werden [120, 121].

5.1.6 T-Zell-Aktivierung im Darm als mögliche Ursache für die längere Latenz der Tumorigenese

Ein weiterer Aspekt, der in Betracht gezogen werden sollte, ist die spezifische T-Zell-Aktivierung sowohl der CD8⁺ T-Zellen als auch der CD4⁺ T-Lymphozyten nach Tamoxifengabe in den Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen. Diese war nur im Darm, nicht im Blut (Daten dazu hier nicht gezeigt) nachweisbar. Es kann nicht

ausgeschlossen werden, dass zum Beispiel vermehrte Tag-induzierte Apoptose eine polyklonale T-Zellantwort im Kolon auslöst. Sobald jedoch das T-Zell-Kompartiment durch Thy 1.2-Antikörpergabe weitestgehend ausgeschaltet wurde, wurden zu einem früheren Zeitpunkt Tag-positive Zellen in höherer Quantität beobachtet.

Die Entstehung von Darmtumoren kann auch in anderen Modellen durch CD8⁺ T-Zellen unterdrückt werden, und nach Ausschaltung derselben stattfinden [122].

5.2 Limitationen der verwendeten Mausmodelle

5.2.1 LoxP-Tag Maus

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle unter Nutzung der SV40 Tag exprimierenden LoxP-Tag-Maus hat wie jedes Tiermodell seine Limitationen. Einerseits ist es ein artifizielles Modell durch die Nutzung eines Onkogens dessen Bedeutung für den Menschen weiterhin unklar bleibt. Andererseits liefert es durch die Entstehung autochthoner Tumoren eine Annäherung an die Realität in Bezug auf die Entstehung sporadischer Tumoren, welche die zahlreichen Transplantationsmodelle oder Entzündungsmodelle mit einer sehr viel kürzeren Latenz nicht bieten können.

5.2.2 Cre-Rekombinase

Die Verwendung von durch Tamoxifen-induzierbarer Aktivierung der Cre-Rekombinase im Cre-ER^{T2}-Modell liefert die Grundlage für eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Tumorentstehung in diesen Mausmodellen. Die Cre-Rekombinase ist abgesehen von den hier beschriebenen seltenen stochastischen Rekombinationen ohne Tamoxifengabe inaktiv [112].

Ein Nachteil der langen Latenz bis zur Tumorentwicklung ist, dass die Mäuse vorher an anderen, unspezifischen Tumoren erkranken können, die auf dem genetischen LoxP-Tag-Hintergrund begründet sind wie beispielsweise Nierentumore [8] oder Osteosarkome [122].

5.2.3 Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag

Es stellte sich im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit heraus, dass der ursprünglich als für den Darm spezifische Stammzellmarker Lgr5 eher ein Stammzellmarker für gastrointestinale Vorläuferzellen ist, was ein Vorkommen in anderen Organen wie Pankreas, Leber, Niere, Magen, et cetera einschließt und in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte. Dieses weit verbreitete Vorkommen von Lgr5-Stammzellen im gastrointestinalen Trakt und über diesen hinaus erschwerte die Analyse einer spezifischen Immunantwort erheblich.

Ohne die Gabe von Tamoxifen blieb bis auf die Entwicklung von zwei Darmtumoren, drei pankreatischen Läsionen und einem Tag-negativen Lebertumor, die Tumorentstehung im gastrointestinalen Trakt vollständig aus. Mit der Gabe von Tamoxifen entwickelten einige Tiere einen Darmtumor neben Tumoren in anderen Organen wie Leber, Pankreas, Magen, Niere sowie Vergrößerungen von Milz und mesenterialen Lymphknoten. Darmtumore traten vermehrt im Zäkum und in der Appendix auf, was ebenso wie im Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell, für einen neuroendokrinen Phänotyp sprechen könnte und diesbezüglich genauer untersucht werden müsste.

5.2.4 Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag

Die sporadische Entstehung von Tumoren im Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell ohne die Gabe von Tamoxifen ist bereits publiziert [114]. Der Nachteil dieses Mausmodells ist die häufigere Entstehung von Dünndarmtumoren als Kolontumoren, was in der Klinik in der sporadischen Entwicklung des CRC wenig Relevanz besitzt.

Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse mit oder ohne Tamoxifenapplikation entwickeln eher eine ZTL-Toleranz als Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäuse und haben in jungem Alter bereits eine reduzierte ZTL-Aktivität im Vergleich zu acht Wochen alten LoxP-Tag-Mäusen.

Aufgrund der B-Zell-Hilfe durch die CD4⁺ T-Lymphozyten und der stetigen Antikörperbildung unabhängig von der Tamoxifengabe lässt sich schlussfolgern, dass die CD4⁺ T-Zelltoleranz weniger ausgeprägt ist als die Toleranz der CD8⁺ T-Lymphozyten. Dies ähnelt den Beobachtungen in Bezug auf die T-Zellantwort zu p53 [123].

In Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen wurde zu keinem Zeitpunkt die Entwicklung eines Thymoms beobachtet, was das Vorkommen von einer Cre-Rekombinase-Expression im Thymus in diesen Mäusen nicht grundlegend ausschließt, aber entscheidend unwahrscheinlich macht [109-110].

Das sporadische Anschalten eines Onkogens verleiht den Zellen sehr wahrscheinlich einen Wachstumsvorteil. Deshalb wurde die Tumorentwicklung in beiden Mausmodellen zunächst ohne Tamoxifengabe untersucht. Die Latenzzeit bis zur Tumorentwicklung in Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag ohne Tamoxifen lag bei durchschnittlich 18 Monaten was signifikant weniger ist als bei Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen (22 Monate).

Somit gab es ohne die Gabe von Tamoxifen eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, dass die schon früh detektierbaren mikroskopischen Läsionen sich zu Tumoren entwickeln.

Durch die hohe Latenz der Tumorentstehung in beiden Mausmodellen ist die Untersuchung des Metastasierungsverhaltens schwierig. Während bei Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mäusen überwiegend Darmtumore mit anderen Läsionen in Leber und Niere, et cetera vorkommen, können im Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell auch isoliert pankreatische oder Leber-Läsionen entstehen, was eine Aussage über den ursprünglichen Tumor in denjenigen Mäusen, die neben Darmtumoren auch andere Tumore haben, sehr diffizil macht.

5.3 Anwendung beim Menschen

Es wurde in zahlreichen Studien die Beteiligung von dem aus dem JC Polyomavirus isolierten SV40 Tag an der menschlichen kolorektalen Tumorigenese mit kontroversen Ergebnissen untersucht [124-126]. 2008 wurde letztlich das Merkelzell-Polyomavirus in der Ätiologie des Merkelzellkarzinoms demaskiert [78].

Ein autochthones Tumormodell spiegelt grundsätzlich die sporadische Natur der CRC-Entstehung und damit seine am häufigsten vorkommende Form wider. Ein genaueres und grundlegendes Verständnis der Tumorigenese im Darm bedingt durch eine Stammzelltransformation stellt einen wichtigen Aspekt zur früheren Diagnosestellung und somit Prognoseverbesserung sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze und die Entwicklung präklinischer Bildgebungen [127] dar.

Trotz der hohen individuellen Variabilität hatten sowohl junge Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag als auch Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag die Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten gegen Epitop IV von Tag beibehalten, trotzdem die durchschnittliche *In vivo* Kill-Aktivität in

diesen Mäusen reduziert war. Die Produktion von anti-Tag spezifischen IgG begann bereits ab vier Wochen nach Tamoxifenapplikation (circa 10-15 Monate bevor der Krebs makroskopisch detektiert wurde), was die Hypothese bestätigt, dass die Entstehung des CRC wahrscheinlich ein langwieriger Prozess ist und, dass das adaptive Immunsystem Tag-positive Zellen bereits in einem frühen Stadium erkennt.

Beim menschlichen Kolonkarzinom wurden Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TILs) mit einer besseren Prognose korreliert [128]. Dennoch wurden zahlreiche TILs in prämaligen Läsionen von LoxP-Tag-Mäusen detektiert, die bereits ZTL-tolerant waren [8]. Ob diese eher eher eine tumorizide als eine Tumor-fördernde inflammatorische Rolle spielen, muss noch genauer untersucht werden.

Die oben beschriebenen Darmtumormodelle, welche die spontane und nicht die hereditäre Form des kolorektalen Karzinoms reflektieren, ermöglichen die lokale und systemische Analyse einer anti-tumorösen Immunantwort während des lang anhaltenden Prozesses der Tumorentstehung und die Testung neuer Therapeutika. Von besonderem Interesse ist dabei die Modulation der Tag-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten, die wesentlich später tolerant werden und die Antikörperbildung durch B-Zellaktivierung fördern. Ein neuer Ansatz könnte dadurch die Vakzinierung mit einem Peptid sein, welches die CD4⁺ T-Zellen dahingehend stimuliert, dass Toleranz- und Tumorentwicklung verhindert werden (Doktorarbeit von Christian Schön).

5.4 Fazit zu diesen Tumormodellen und Ausblick

Um abschließend eine genaue Aussage über die zugrunde liegenden Mechanismen treffen zu können, sind weitere Analysen notwendig. Erstens müsste die T-Zell-Aktivierung, zum Beispiel in Bezug auf Spezifität, genauer analysiert und charakterisiert werden unter Berücksichtigung eines zeitlichen Verlaufes. Dann könnte das Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell mit einem weiteren genetischen Mutagen zur Beschleunigung und Erhöhung der Effizienz der Darmtumorentstehung kombiniert werden, wie zum Beispiel APC knockout, welches für die Tumorentstehung in Lgr5-exprimierenden Stammzellen notwendig erscheint [129]. Ein weiterer vielversprechender Stammzellmarker ist Prom1 (CD133), der spezifisch für das Stammzellkompartiment im Dünndarm ist und Darmtumore initiieren kann [130]. Dieser könnte ebenso durch eine Verpaarung mit LoxP-Tag zur Analyse einer darmspezifischen Immunantwort dienen. In Bezug auf Vil-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag wäre

die Kombination mit chronischer Inflammation im Darm interessant (Projekt von Dr. Mathias Friedrich). Hier könnten ebenso eine darmspezifische lokale Analyse des Immunsystems und die Charakterisierung der T-Zellen über ihre Zytokinproduktion erfolgen.

Weiterhin sollten andere Tumor-initiiierende Zellmarker untersucht werden. Dazu zählen, neben Lgr5, andere Marker wie CD44, CD133, EpCAM, CD24, CD166, CD47 und ALDH1, die Zellen mit tumorigenem Potential kennzeichnen [131].

Ein Schritt, der zuvor erfolgen sollte, ist die genauere Charakterisierung der Tumor-initiiierenden Zellen. Sie sollten neben A-Kriterien wie dem Potenzial zur Selbsterneuerung, Pluripotenz und Plastizität, Fähigkeit des Umschaltens zwischen Ruhezustand und Proliferation auch B-Kriterien wie eine geringe Apoptoserate und eine hohe Chemoresistenz, die Fähigkeit zur Kommunikation mit dem Mikromilieu, die Autonomie von der Gewebeintegrität, Migrationsfähigkeit bzw. Metastasierungswirksamkeit erfüllen [132]. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Differenzierung der oben genannten Zelltypen in Kolonstammzellen (CSCs) und Zellen mit CSC-Aktivität [133]. Ausdifferenzierte Kolonkrebszellen und Krebsstammzellen befinden sich in einem ständigen Fluss, der durch Signale aus dem umliegenden Tumorstroma bedingt wird.

Wenn die zugrunde liegenden Mechanismen der Darmtumorentstehung aus Stammzellen ans Licht gebracht werden, können diese Stammzellen zur Wundheilung [134] oder Regeneration ganzer Organe genutzt werden. Der Arbeitsgruppe von Hans Clevers ist es bereits gelungen Lgr5⁺ Leberstammzellen *in vitro* zu regenerieren [75, 135-136]. Wenn eine Translation dieser Ergebnisse *in vivo* gelänge, könnten Fremdtransplantationen durch Transplantation eigener Hepatozyten ersetzt werden.

Diese Erfolge sind vielversprechend und weisen weiteren Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Krebsstammzellforschung auf.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Institut Jules Bordet: A.H.d.B.-C.d.T.d.ULB. *The History of Cancer*. 2014 [accessed 01 Jan 2015]; Available from: bordet.be.
2. Marte, B., *Milestone 2: (1890) Cancer as a genetic disease, Lack of principles*. Nature, 2006.
3. Hansemann, D., *Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung*. Archiv f. pathol. Anat., 1890. **119**(2): p. 299-326.
4. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Chemotherapie*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1909. **42**(1): p. 17-47.
5. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon, *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-1647.
6. Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-1111.
7. Willimsky, G. and T. Blankenstein, *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 141-146.
8. Willimsky, G., M. Czéh, C. Loddenkemper, J. Gellermann, K. Schmidt, P. Wust, H. Stein, and T. Blankenstein, *Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness*. Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(7): p. 1687-1700.
9. Kammertoens, T. and T. Blankenstein, *Making and circumventing tolerance to cancer*. European Journal of Immunology, 2009. **39**(9): p. 2345-2353.
10. Casás-Selves, M. and J. DeGregori, *How cancer shapes evolution, and how evolution shapes cancer*. Evolution, 2011. **4**(4): p. 624-634.
11. Zaretsky, Jesse M., A. Garcia-Diaz, D.S. Shin, H. Escuin-Ordinas, W. Hugo, S. Hu-Lieskovan, D.Y. Torrejon, G. Abril-Rodriguez, S. Sandoval, L. Barthly, J. Saco, B. Homet Moreno, R. Mezzadra, B. Chmielowski, K. Ruchalski, I.P. Shintaku, P.J. Sanchez, C. Puig-Saus, G. Cherry, E. Seja, X. Kong, J. Pang, B. Berent-Maoz, B. Comin-Anduix, T.G. Graeber, P.C. Tumeh, T.N.M. Schumacher,

-
- R.S. Lo, and A. Ribas, *Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2016. 375(9): p. 819-829.
12. Rogers, L.M., A.K. Olivier, D.K. Meyerholz, and A.J. Dupuy, *Adaptive immunity does not strongly suppress spontaneous tumors in a Sleeping Beauty model of cancer*. The Journal of Immunology, 2013. **190**(8): p. 4393-4399.
 13. WHO Cancer. *Fact Sheet N° 297*. 2014 [accessed 01 Jan 2015]; Available from: who.int.
 14. Boyle, P., *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Annals of Oncology, 2005. **16**(3): p. 481-488.
 15. Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, and M.J. Thun, *Cancer Statistics, 2006*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2006. **56**(2): p. 106-130.
 16. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nature Medicine, 2004. **10**(8): p. 789-799.
 17. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from Hereditary Colorectal Cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-170.
 18. Kinzler, K.W., *ONCOGENESIS: Landscaping the Cancer Terrain*. Science, 1998. **280**(5366): p. 1036-1037.
 19. Heyer, J., K. Yang, M. Lipkin, W. Edelmann, and R. Kucherlapati, *Mouse models for colorectal cancer*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5325-5333.
 20. Boivin, G.P., K. Washington, K. Yang, J.M. Ward, T.P. Pretlow, R. Russell, D.G. Besselsen, V.L. Godfrey, T. Doetschman, W.F. Dove, H.C. Pitot, R.B. Halberg, S.H. Itzkowitz, J. Groden, and R.J. Coffey, *Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations*. Gastroenterology, 2003. **124**(3): p. 762-777.
 21. Humphries, A. and N.A. Wright, *Colonic crypt organization and tumorigenesis*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(6): p. 415-424.
 22. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-767.
 23. Furth, J. and M.C. Kahn, *The transmission of leukemia of mice with a single cell*. American Journal of Cancer, 1937(31): p. 276-282.

24. Bruce, W.R. and H. Van Der Gaag, *A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells capable of Proliferation in vivo*. *Nature*, 1963. **199**(4888): p. 79-80.
25. Becker, A.J., E.A. McCulloch, and J.E. Till, *Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells*. *Nature*, 1963. **197**(4866): p. 452-454.
26. Buick, R.N., J.E. Till, and E.A. McCulloch, *Colony assay for proliferative blast cells circulating in myeloblastic leukaemia*. *Lancet*, 1977. **309**(8016): p. 862-863.
27. Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick, *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-648.
28. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nature Medicine*, 1997. **3**(7): p. 730-737.
29. Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke, *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(7): p. 3983-3988.
30. Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks, *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
31. Barker, N., M. van de Wetering, and H. Clevers, *The intestinal stem cell*. *Genes & Development*, 2008. **22**(14): p. 1856-1864.
32. Barker, N., J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P.J. Peters, and H. Clevers, *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5**. *Nature*, 2007. **449**(7165): p. 1003-1007.
33. Potten, C.S., *Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions*. *Bull Cancer*, 1975. **62**(4): p. 419-30.
34. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2nd ed. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlagsgruppe.
35. Barker, N., R.A. Ridgway, J.H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A.R. Clarke, O.J. Sansom, and H. Clevers, *Crypt stem*

- cells as the cells-of-origin of intestinal cancer*. Nature, 2008. **457**(7229): p. 608-611.
36. Moolgavkar, S.H. and E.G. Luebeck, *Multistage carcinogenesis and the incidence of human cancer*. Genes Chromosom. Cancer, 2003. **38**(4): p. 302-306.
37. Wang, J.C.Y. and J.E. Dick, *Cancer stem cells: lessons from leukemia*. Trends in Cell Biology, 2005. **15**(9): p. 494-501.
38. Gregorieff, A., *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. Genes & Development, 2005. **19**(8): p. 877-890.
39. Bjerknes, M. and H. Cheng, *Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors*. Gastroenterology, 1999. **116**(1): p. 7-14.
40. Potten, C.S., C. Booth, and D.M. Pritchard, *The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor*. International Journal of Experimental Pathology, 1997. **78**(4): p. 219-243.
41. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types*. American Journal of Anatomy, 1974. **141**(4): p. 537-561.
42. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell*. American Journal of Anatomy, 1974. **141**(4): p. 461-479.
43. Marshman, E., C. Booth, and C.S. Potten, *The intestinal epithelial stem cell*. Bioessays, 2002. **24**(1): p. 91-98.
44. Bjerknes, M. and H. Cheng, *The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse*. American Journal of Anatomy, 1981. **160**(1): p. 65-75.
45. Bjerknes, M. and H. Cheng, *The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from paneth cells in the adult mouse*. American Journal of Anatomy, 1981. **160**(1): p. 51-63.
46. Ireland, H., C. Houghton, L. Howard, and D.J. Winton, *Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine*. Dev. Dyn., 2005. **233**(4): p. 1332-1336.

47. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(5): p. 349-359.
48. van Es, J.H., M.E. van Gijn, O. Riccio, M. van den Born, M. Vooijs, H. Begthel, M. Cozijnsen, S. Robine, D.J. Winton, F. Radtke, and H. Clevers, *Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells*. *Nature*, 2005. **435**(7044): p. 959-963.
49. Batlle, E., J.T. Henderson, H. Begthel, M.M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson, and H. Clevers, *β -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB*. *Cell*, 2002. **111**(2): p. 251-263.
50. Shih, I.M., T.L. Wang, G. Traverso, K. Romans, S.R. Hamilton, S. Ben-Sasson, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Top-down morphogenesis of colorectal tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(5): p. 2640-2645.
51. Preston, S.L., W.M. Wong, A.O. Chan, R. Poulson, R. Jeffery, R.A. Goodlad, N. Mandir, G. Elia, M. Novelli, W.F. Bodmer, I.P. Tomlinson, and N.A. Wright, *Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission*. *Cancer Res*, 2003. **63**(13): p. 3819-25.
52. Wong, W.M., *Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission*. *Gut*, 2002. **50**(2): p. 212-217.
53. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2003. **3**(12): p. 895-902.
54. Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers, *Live and let die in the intestinal epithelium*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(6): p. 763-70.
55. Hsu, S.Y., *Characterization of Two LGR Genes Homologous to Gonadotropin and Thyrotropin Receptors with Extracellular Leucine-Rich Repeats and a G Protein-Coupled, Seven-Transmembrane Region*. *Molecular Endocrinology*, 1998. **12**(12): p. 1830-1845.
56. van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H.

- Clevers, *The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells*. *Cell*, 2002. **111**(2): p. 241-250.
57. McClanahan, T., S. Koseoglu, K. Smith, J. Grein, E. Gustafson, S. Black, P. Kirschmeier, and A.A. Samatar, *Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors*. *Cancer Biology & Therapy*, 2006. **5**(4): p. 419-426.
58. Yamamoto, Y., *Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with β -catenin mutations*. *Hepatology*, 2003. **37**(3): p. 528-533.
59. Barker, N. and H. Clevers, *Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors as Markers of Adult Stem Cells*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1681-1696.
60. Hsu, S.Y., *The Three Subfamilies of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the Signaling Mechanism for LGR7*. *Molecular Endocrinology*, 2000. **14**(8): p. 1257-1271.
61. de Lau, W., N. Barker, T.Y. Low, B.K. Koo, V.S. Li, H. Teunissen, P. Kujala, A. Haegebarth, P.J. Peters, M. van de Wetering, D.E. Stange, J.E. van Es, D. Guardavaccaro, R.B. Schasfoort, Y. Mohri, K. Nishimori, S. Mohammed, A.J. Heck, and H. Clevers, *Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 293-297.
62. Barker, N., M. Huch, P. Kujala, M. van de Wetering, H.J. Snippert, J.H. van Es, T. Sato, D.E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, S. van den Brink, J. Korving, A. Abo, P.J. Peters, N. Wright, R. Poulsom, and H. Clevers, *Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(1): p. 25-36.
63. Jaks, V., N. Barker, M. Kasper, J.H. van Es, H.J. Snippert, H. Clevers, and R. Toftgård, *Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells*. *Nature Genetics*, 2008. **40**(11): p. 1291-1299.
64. Snippert, H.J., A. Haegebarth, M. Kasper, V. Jaks, J.H. van Es, N. Barker, M. van de Wetering, M. van den Born, H. Begthel, R.G. Vries, D.E. Stange, R. Toftgård, and H. Clevers, *Lgr6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin*. *Science*, 2010. **327**(5971): p. 1385-1389.
65. Leushacke, M. and N. Barker, *Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer*. *Oncogene*, 2011. **31**(25): p. 3009-3022.

66. Schoore, G.V., F. Mendive, R. Pochet, and G. Vassart, *Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2005. **124**(1): p. 35-50.
67. Mustata, R.C., T. Van Loy, A. Lefort, F. Libert, S. Stollo, G. Vassart, and M.I. Garcia, *Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo*. *EMBO Rep*, 2011. **12**(6): p. 558-564.
68. van der Flier, L.G., M.E. van Gijn, P. Hatzis, P. Kujala, A. Haegebarth, D.E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, V. Guryev, I. Oving, J.H. van Es, N. Barker, P.J. Peters, M. van de Wetering, and H. Clevers, *Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate*. *Cell*, 2009. **136**(5): p. 903-912.
69. Mazerbourg, S., D.M. Bouley, S. Sudo, C.A. Klein, J.V. Zhang, K. Kawamura, L.V. Goodrich, H. Rayburn, M. Tessier-Lavigne, and A.J. Hsueh, *Leucine-Rich Repeat-Containing, G Protein-Coupled Receptor 4 Null Mice Exhibit Intrauterine Growth Retardation Associated with Embryonic and Perinatal Lethality*. *Molecular Endocrinology*, 2004. **18**(9): p. 2241-2254.
70. Barker, N., M.B. Rookmaaker, P. Kujala, A. Ng, M. Leushacke, H. Snippert, M. van de Wetering, S. Tan, J.H. Van Es, M. Huch, R. Poulsom, M.C. Verhaar, P.J. Peters, and H. Clevers, *Lgr5+ve Stem/Progenitor Cells Contribute to Nephron Formation during Kidney Development*. *Cell Reports*, 2012. **2**(3): p. 540-552.
71. Ng, A., S. Tan, G. Singh, P. Rizk, Y. Swathi, T.Z. Tan, R.Y. Huang, M. Leushacke, and N. Barker, *Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia*. *Nature Cell Biology*, 2014. **16**(8): p. 745-757.
72. Capel, B., *Ovarian epithelium regeneration by Lgr5+ cells*. *Nature Cell Biology*, 2014. **16**(8): p. 743-744.
73. Krulova, M., K. Pokorna, A. Lencova, J. Fric, A. Zajicova, M. Filipec, J.V. Forrester, and V. Holan, *A Rapid Separation of Two Distinct Populations of Mouse Corneal Epithelial Cells with Limbal Stem Cell Characteristics by Centrifugation on Percoll Gradient*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008. **49**(9): p. 3903.
74. Huch, M., P. Bonfanti, S.F. Boj, T. Sato, C.J. Loomans, M. van de Wetering, M. Sojoodi, V.S. Li, J. Schuijers, A. Gracanin, F. Ringnalda, H. Begthel, K. Hamer, J. Mulder, J.H. van Es, E. de Koning, R.G. Vries, H. Heimberg, and H. Clevers, *Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis*. *EMBO J*, 2013. **32**(20): p. 2708-2721.

75. Huch, M., C. Dorrell, S.F. Boj, J.H. van Es, V.S. Li, M. van de Wetering, T. Sato, K. Hamer, N. Sasaki, M.J. Finegold, A. Haft, R.G. Vries, M. Grompe, and H. Clevers, *In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 247-250.
76. Sweet, B.H. and M.R. Hilleman, *The Vacuolating Virus, S.V.40*. Experimental Biology and Medicine, 1960. **105**(2): p. 420-427.
77. Sariyer, I.K., I. Akan, L. Del Valle, K. Khalili, and M. Safak, *Tumor induction by simian and human polyomaviruses*. Cancer Therapy, 2004. **2**: p. 85-98.
78. Feng, H., M. Shuda, Y. Chang, and P.S. Moore, *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1096-1100.
79. Eddy, B.E., G.S. Borman, G.E. Grubbs, and R.D. Young, *Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40*. Virology, 1962. **17**(1): p. 65-75.
80. Girardi, A.J., B.H. Sweet, V.B. Slotnik, and M.R. Hilleman, *Development of Tumors in Hamsters Inoculated in the Neonatal Period with Vacuolating Virus, SV40*. Experimental Biology and Medicine, 1962. **109**(3): p. 649-660.
81. Butel, J.S., S.S. Tevethia, and J.L. Melnick, *Oncogenicity And Cell Transformation By Papovavirus SV40: The Role Of The Viral Genome*, in *Advances in Cancer Research*. 1972, Elsevier BV. p. 1-55.
82. Melnick, J.L. and S. Stinebaugh, *Excretion of Vacuolating SV-40 Virus (Papova Virus Group) After Ingestion as a Contaminant of Oral Poliovaccine*. Experimental Biology and Medicine, 1962. **109**(4): p. 965-968.
83. Soriano, F., C.E. Shelburne, and M. Gökçen, *Simian virus 40 in a human cancer*. Nature, 1974. **249**(5456): p. 421-424.
84. Carbone, M., H.I. Pass, P. Rizzo, M. Marinetti, M. Di Muzio, D.J. Mew, A.S. Levine, and A. Procopio, *Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1781-90.
85. Griffiths, D.J., A.G. Nicholson, and R.A. Weiss, *Detection of SV40 sequences in human mesothelioma*. Dev Biol Stand, 1998. **94**: p. 127-36.
86. Rizzo, P., I. Di Resta, A. Powers, C.M. Matker, A. Zhang, L. Mutti, W.M. Kast, H. Pass, and M. Carbone, *The detection of simian virus 40 in human tumors by polymerase chain reaction*. Monaldi Arch Chest Dis, 1998. **53**(2): p. 202-10.

87. Rizzo, P., *Simian Virus 40 Is Present in Most United States Human Mesotheliomas, but It Is Rarely Present in Non-Hodgkin's Lymphoma*. Chest, 1999. **116**(6 Suppl): p. 470s-473s.
88. Testa, J.R., M. Carbone, A. Hirvonen, K. Khalili, B. Krynska, K. Linnainmaa, F.D. Pooley, P. Rizzo, V. Rusch, and G.H. Xiao, *A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4505-9.
89. Shivapurkar, N., T. Wiethage, I.I. Wistuba, S. Milchgrub, K.M. Muller, and A.F. Gazdar, *Presence of simian virus 40 sequences in malignant pleural, peritoneal and noninvasive mesotheliomas*. International Journal of Cancer, 2000. **85**(5): p. 743-745.
90. Weiss, A.F., R. Portmann, H. Fischer, J. Simon, and K.D. Zang, *Simian virus 40-related antigens in three human meningiomas with defined chromosome loss*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975. **72**(2): p. 609-613.
91. Krieg, P., E. Amtmann, D. Jonas, H. Fischer, K. Zang, and G. Sauer, *Episomal simian virus 40 genomes in human brain tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(10): p. 6446-6450.
92. Bergsagel, D.J., M.J. Finegold, J.S. Butel, W.J. Kupsky, and R.L. Garcea, *DNA Sequences Similar to Those of Simian Virus 40 in Ependymomas and Choroid Plexus Tumors of Childhood*. New England Journal of Medicine, 1992. **326**(15): p. 988-993.
93. Lednicky, J.A., R.L. Garcea, D.J. Bergsagel, and J.S. Butel, *Natural Simian Virus 40 Strains Are Present in Human Choroid Plexus and Ependymoma Tumors*. Virology, 1995. **212**(2): p. 710-717.
94. Martini, F., L. Iaccheri, L. Lazzarin, P. Carinci, A. Corallini, M. Gerosa, P. Iuzzolino, G. Barbanti-Brodano, and M. Tognon, *SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4820-5.
95. Carbone, M., P. Rizzo, A. Procopio, M. Giuliano, H.I. Pass, M.C. Gebhardt, C. Mangham, M. Hansen, D.F. Malkin, G. Bushart, F. Pompetti, P. Picci, A.S. Levine, J.D. Bergsagel, and R.L. Garcea, *SV40-like sequences in human bone tumors*. Oncogene, 1996. **13**(3): p. 527-35.

96. Lednicky, J.A. and J.S. Butel, *A coupled PCR and restriction digest method for the detection and analysis of the SV40 regulatory region in infected-cell lysates and clinical samples*. Journal of Virological Methods, 1997. **64**(1): p. 1-9.
97. Butel, J.S., A.S. Arrington, C. Wong, J.A. Lednicky, and M.J. Finegold, *Molecular Evidence of Simian Virus 40 Infections in Children*. The Journal of Infectious Diseases, 1999. **180**(3): p. 884-887.
98. David, H., S. Mendoza, T. Konishi, and C.W. Miller, *Simian virus 40 is present in human lymphomas and normal blood*. Cancer Letters, 2001. **162**(1): p. 57-64.
99. Grodzicker, T. and N. Hopkins, *Origins of contemporary DNA tumor virus research*. 2nd: DNA tumor viruses ed. 1980, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
100. Ludlow, J.W., *Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53*. Faseb j, 1993. **7**(10): p. 866-71.
101. Ahuja, D., M.T. Sáenz-Robles, and J.M. Pipas, *SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7729-7745.
102. Butel, J.S. and J.A. Lednicky, *Cell and Molecular Biology of Simian Virus 40: Implications for Human Infections and Disease*. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 1999. **91**(2): p. 119-134.
103. Fanning, E., *Simian virus 40 large T antigen: the puzzle, the pieces, and the emerging picture*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1289-93.
104. Fanning, E. and R. Knippers, *Structure and Function of Simian Virus 40 Large Tumor Antigen*. Annu. Rev. Biochem., 1992. **61**(1): p. 55-85.
105. Sauer, B., *Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem*. Methods, 1998. **14**(4): p. 381-392.
106. Nagy, A., *Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring*. genesis, 2000. **26**(2): p. 99-109.
107. Pinto, D., S. Robine, F. Jaisser, F.E. El Marjou, and D. Louvard, *Regulatory Sequences of the Mouse Villin Gene That Efficiently Drive Transgenic Expression in Immature and Differentiated Epithelial Cells of Small and Large Intestines*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(10): p. 6476-6482.
108. Voziyanov, Y., *A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases*. Nucleic Acids Research, 1999. **27**(4): p. 930-941.

109. Madison, B.B., *cis Elements of the Villin Gene Control Expression in Restricted Domains of the Vertical (Crypt) and Horizontal (Duodenum, Cecum) Axes of the Intestine*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(36): p. 33275-33283.
110. El Marjou, F., K.P. Janssen, B.H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine, *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. genesis, 2004. **39**(3): p. 186-193.
111. Feil, R., J. Wagner, D. Metzger, and P. Chambon, *Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **237**(3): p. 752-757.
112. Zhang, B., N.A. Bowerman, J.K. Salama, H. Schmidt, M.T. Spiotto, A. Schietinger, P. Yu, Y.X. Fu, R.R. Weichselbaum, D.A. Rowley, D.M. Kranz, and H. Schreiber, *Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(1): p. 49-55.
113. Otahal, P., T.D. Schell, S.C. Hutchinson, B.B. Knowles, and S.S. Tevethia, *Early Immunization Induces Persistent Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells against an Immunodominant Epitope and Promotes Lifelong Control of Pancreatic Tumor Progression in SV40 Tumor Antigen Transgenic Mice*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(5): p. 3089-3099.
114. Czéh, M., C. Loddenkemper, S. Shalapour, C. Schön, S. Robine, E. Goldscheid, H. Stein, T. Schüler, G. Willimsky, and T. Blankenstein, *The immune response to sporadic colorectal cancer in a novel mouse model*. Oncogene, 2010. **29**(50): p. 6591-6602.
115. Flood, P.M., X. Liu, R. Alexander, H. Schreiber, and S. Haque, *Loss of Resistance to a Highly Immunogenic Tumor with Age Corresponds to the Decline of CD8 T Cell Activity*. Journal of Immunotherapy, 1998. **21**(4): p. 307-316.
116. Zhu, Y., Y.F. Huang, C. Kek, and D.V. Bulavin, *Apoptosis Differently Affects Lineage Tracing of Lgr5 and Bmi1 Intestinal Stem Cell Populations*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(3): p. 298-303.
117. Universitätsklinikum München. *Tätigkeitsbericht LIFE-Zentrum*. 2011 [accessed 01 Jan 2015]; Available from: uni-muenchen.de.
118. Luche, H., O. Weber, T. Nageswara Rao, C. Blum, and H.J. Fehling, *Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter*

- mice ideally suited for lineage tracing studies*. European Journal of Immunology, 2007. **37**(1): p. 43-53.
119. Diefenbach, A., *Interleukin-22, the Guardian of the Intestinal Stem Cell Niche?* Immunity, 2012. **37**(2): p. 196-198.
120. Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
121. Schwitalla, S., P.K. Ziegler, D. Horst, V. Becker, I. Kerle, Y. Begus-Nahrman, A. Lechel, K.L. Rudolph, R. Langer, J. Slotta-Huspenina, F.G. Bader, O. Prazeres da Costa, M.F. Neurath, A. Meining, T. Kirchner, and F.R. Greten, *Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors*. Cancer Cell, 2013. **23**(1): p. 93-106.
122. Schell, T.D., B.B. Knowles, and S.S. Tevethia, *Sequential loss of cytotoxic T lymphocyte responses to simian virus 40 large T antigen epitopes in T antigen transgenic mice developing osteosarcomas*. Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3002-12.
123. Lauwen, M.M., S. Zwaveling, L. de Quartel, S.C. Ferreira Mota, J.A. Grashorn, C.J. Melief, S.H. van der Burg, and R. Offringa, *Self-Tolerance Does Not Restrict the CD4+ T-Helper Response against the p53 Tumor Antigen*. Cancer Research, 2008. **68**(3): p. 893-900.
124. Newcomb, P.A., A.C. Bush, G.L. Stoner, J.W. Lampe, J.D. Potter, and J. Bigler, *No evidence of an association of JC virus and colon neoplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(4): p. 662-6.
125. Hori, R., Y. Murai, K. Tsuneyama, H.O. Abdel-Aziz, K. Nomoto, H. Takahashi, C.M. Cheng, T. Kuchina, B.V. Harman, and Y. Takano, *Detection of JC virus DNA sequences in colorectal cancers in Japan*. Virchows Archiv, 2005. **447**(4): p. 723-730.
126. Weinreb, D.B., *Re: Detection of JC virus sequences in colorectal cancers in Japan*. Virchows Archiv, 2005. **448**(2): p. 239-239.
127. Conway, J.R.W., N.O. Carragher, and P. Timpson, *Developments in preclinical cancer imaging: innovating the discovery of therapeutics*. Nature Reviews Cancer, 2014. **14**(5): p. 314-328.

128. Pagès, F., J. Galon, M.C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman, and W.H. Fridman, *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. *Oncogene*, 2009. **29**(8): p. 1093-1102.
129. McCarthy, N., *Cancer stem cells: Can mutated stem cells produce tumours?* *Nature Reviews Cancer*, 2009. **9**(2): p. 74-74.
130. Shmelkov, S.V., J.M. Butler, A.T. Hooper, A. Hormigo, J. Kushner, T. Milde, R. St Clair, M. Baljevic, I. White, D.K. Jin, A. Chadburn, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, N.W. Gale, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, M. D'Angelica, N. Kemeny, D. Lyden, and S. Rafii, *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. *Journal of Clinical Investigation*, 2008.
131. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**(10): p. 755-768.
132. Gires, O., *Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011. **68**(24): p. 4009-4022.
133. Vermeulen, L. and H.J. Snippert, *Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine*. *Nature Reviews Cancer*, 2014. **14**(7): p. 468-480.
134. Arwert, E.N., E. Hoste, and F.M. Watt, *Epithelial stem cells, wound healing and cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2012. **12**(3): p. 170-180.
135. Haegbarth, A. and H. Clevers, *Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin*. *The American Journal of Pathology*, 2009. **174**(3): p. 715-721.
136. Huch, M., S.F. Boj, and H. Clevers, *Lgr5 + liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine*. *Regenerative Medicine*, 2013. **8**(4): p. 385-387.

ABKÜRZUNGS- UND AKRONYMVERZEICHNIS

ACF:

Aberrante Krypt-Foci

AWMF:

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
e.V.

APC-Gen:

Adenomatosis polyposis coli-Gen

BAX:

Reduntanter Regulator des intrinsischen Weges des mitochondrialen Zelltodes

BMP:

Bone morphogenetic protein

CAG:

CMV early enhancer/chicken β actin

CBC:

Columnar Base cells

CEA:

Carcinoembryonales Antigen

c-Myc:

Zelluläres Myc-Onkogen; Lokalisation in der Region auf Chromosom 8, die bei den meisten undifferenzierten B-Zell-Lymphomen auf Chromosom 14 transloziert ist

CRC:

Kolorektales Karzinom

Cre-Rekombinase:

Teil des Cre-/LoxP-Rekombinationssystems; besteht aus vier Untereinheiten und katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen

CSC:

Kolonstammzelle

E2F-Transkriptionsfaktor:

bindet des Retinoblastom-Protein; wirkt dadurch wie Wachstumssuppressor

eGFP:

Enhanced green fluorescent protein

EGFR:

Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

ELISA:

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FAP:

Familiäre adenomatöse Polyposis

FFPE:

Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (Gewebe)

Frizzled/Lrp-Wnt-Rezeptorkomplex:

Aktivierung des klassischen (kanonischen) Wnt-Signalweges führt zur Translokation von β -Catenin in den Kern und zur dortigen Aktivierung des T-Zell-Faktor (Tcf)/Lymphoider Enhancer Faktor (Lef)

FSH:

Follikel-stimulierendes Hormon

GIST:

Gastrointestinaler Stromatumor

Hedgehog:

Wichtiger Signaltransduktionsweg der Embryonalentwicklung; Fehlfunktion führt zu massiven Fehlbildungen in der Embryonalzeit oder Krebsentstehung beim Erwachsenen

HNPCC:

Hereditäres nicht-polypomatöses Kolorektales Karzinom (Lynch-Syndrom)

IL-22:

Interleukin-22; wird von NK-Zellen produziert und induziert Akute Phase Proteine; besitzt zudem eine pro-inflammatorische Wirkung

ILC:

Innate lymphoid cell

IRES:

Interne ribosomale Eintrittsstelle

K-Ras:

Gehört der Ras-Proto-Onkogen-Familie an; neben K-Ras gibt es H-Ras und N-Ras, die alle mit einer unterschiedlichen Prävalenz in den verschiedenen Tumorarten vorkommen

Lgr5:

Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled-receptor 5; Gpr49; intestinales Wnt-Zielgen

LH:

Luteiniserendes Hormon

MMR:

Mutiertes Mismatch-Repair

Notch:

Der Notch-Signalweg ist in der Bestimmung des Zellschicksals impliziert und besitzt seine Funktion in der Spezifizierung der lymphoiden Zelllinie. Die Notch-Familie umfasst Transmembranrezeptoren, welche die Transkription regulieren indem sie nach Bindung eines Liganden eine intrazelluläre zytoplasmatische Domäne freilassen, welche in den Nukleus transloziert wird um dort mit dem Transkriptionsrepressor CSL zu interagieren.

NSAID:

Non-steroidal anti-inflammatory drugs

p53:

Tumorsuppressorprotein 53; Zellzyklus-Checkpoint-Protein

PCR:

Polymerase chain reaction

PD-1:

Programmed death 1

Polyomavirus:

Unbehüllte DNA-Viren, die in Nagern und beim Menschen zu persistierenden Infektionen führen können, aber meist als harmlose Passengerviren gelten

pRb:

Retinoblastom-Protein

RORgt:

Transkriptionsfaktor, der bei der Differenzierung von T_{H2}- und T_{H17}-Zellen involviert ist

SB:

Sleeping Beauty

SV40 Tag:

Simian Virus 40 Large T-Antigen

TA-Zellen:

Transit Amplifying-Zellen

TGF- β -Rezeptor:

Transformierender Wachstumsfaktor- β -Rezeptor

TIL:

Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten

TSH:

Thyreoidea-stimulierendes Hormon

VEGF:

Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

Wnt/ β -Catenin-Signalweg:

Aktivierung führt zur Zunahme von Zellproliferation und Abnahme der Apoptoserate der frühen B-Zelllinie

ZTL:

Zytotoxische T-Lymphozyten

Zyklin D:

Mitglied der Zyklinproteinfamilie, welche die Zellzyklusprogression reguliert; Zyklin D ist verantwortlich für die Transition von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus

Quellen:

Murphy, KP, Janeway's Immunobiology. In: Murphy KP, ed. Janeway's Immunobiology. 7th ed. USA: Garland Science, 2012.

Paul WE. The Immune System. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2013.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Josephine Jung, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Immunantwort gegen Kolontumoren im Villin-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag- und Lgr5-Cre-ER^{T2} x LoxP-Tag-Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 08. Oktober 2016

J. Jung

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Josephine Jung hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

keine

Unterschrift/ Datum/ Stempel Hochschullehrer

J. Jung

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich selbstverständlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Blankenstein und meinem Betreuer Dr. rer. nat. Gerald Willimsky bedanken. Ohne deren Erfahrung, Klugheit, Gelassenheit, Geduld und fortwährende Begleitung wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Die zahlreichen anregenden Diskussionen und die teilweise schonungslos erteilte Kritik haben mich immer voran getrieben. Die Tür zu ihren Büros stand immer offen, um von ihnen konstruktive Ratschläge oder tatkräftige Unterstützung zu erhalten.

Ferner gebührt mein Dank ebenso allen Kollegen des Labors für Tumorimmunologie sowohl am Institut für Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin als auch am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch.

Ohne dabei den Anspruch auf Vollständigkeit erheben zu wollen möchte ich mich insbesondere bei Christian Schön, Dana Hoser, Sabrina Horn, Katrin Dieser, Florian Helm, Kristin Retzlaff, Kathrin Borgwald, Dr. Mathias Friedrich und Michael Rothe. Ihre Zuverlässigkeit, stetige Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Kompetenz ermöglichten mir immer ein überaus produktives, sehr angenehmes Arbeiten und ließen mich immer gerne ins Labor kommen.

Des Weiteren bedanke ich mich natürlich bei Doreen Vorpagel und Daniel Stepczynski dafür, dass die Kooperation in Bezug auf die Mauszucht und Tierpflege so reibungslos geklappt hat.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihren Rat und Beistand, ihr Verständnis und Interesse danken.

CURRICULUM VITAE

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