

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Burkhard Göke

**Etablierung genetischer Modellsysteme der
kolorektalen Karzinogenese und Abhängigkeit onkogener
Merkmale von B-Raf^{V600E}**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Benjamin Hirschi

aus Bünde

2012

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Andreas E. Herbst

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2012

Meinem Großvater Fritz Knaps (1911-2007).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Krebs.....	1
1.2	Darmkrebs.....	2
1.3	Optionen in der Tumortherapie.....	2
1.4	Merkmale einer Krebserkrankung.....	5
1.4.1	Das Hanahan-Weinberg-Modell.....	5
1.4.2	Resistenz gegen Zelltod.....	6
1.4.3	Selbstversorgung mit Wachstumssignalen.....	7
1.4.4	Resistenz gegen Inhibition der Proliferation.....	7
1.4.5	Entzündung.....	8
1.4.6	Invasivität und Metastasierung.....	8
1.4.7	Redundanz und Oncogene Addiction.....	8
1.5	Modelle der kolorektalen Karzinogenese.....	8
1.5.1	Das Vogelstein-Modell.....	9
1.5.2	Das Jass-Modell.....	10
1.6	Zelluläre Signalwege.....	12
1.6.1	Der MAP-Kinase Signalweg.....	12
1.6.2	Hyperaktivierung des MAPK-Signalweges.....	13
1.6.3	Wechselwirkungen zwischen Signalwegen.....	14
1.7	BRAF als Onkogen.....	14
1.7.1	Proto-Onkogene.....	14
1.7.2	Das Onkogen BRAF.....	15
1.7.3	Klinische Bedeutung.....	16
1.8	Individualisierte Therapie.....	17
1.8.1	Individualisierte Therapie im kolorektalen Karzinom.....	17
1.8.2	Herausforderungen in der personalisierten Therapie.....	18
1.9	Neue B-Raf Isoformen.....	18
1.9.1	Grundlagen des Spleißens.....	19
1.9.2	Alternatives Spleißen des BRAF-Gens.....	19
1.10	Experimentelle Untersuchung von Onkogenen.....	20
1.10.1	in vitro-Methoden.....	20
1.10.2	in vivo-Modelle.....	22
1.11	E-Cadherin und Darmkrebs.....	24
1.11.1	Aufbau des Darmepithels.....	25
1.11.2	E-Cadherin als Strukturprotein im Darmepithel.....	25
2	Fragestellungen.....	26
2.1	B-Raf – genetisches Modell.....	26
2.2	B-Raf Isoformen.....	26
2.3	E-Cadherin in der Kanzerogenese.....	26
3	Methoden.....	27

3.1	Standardbedingungen für Enzyme, Bakterien und Zellkultur.....	27
3.2	Western-Blot.....	28
3.3	Plasmid-Isolierung.....	28
3.4	Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	29
3.5	Kompetente Bakterien E.coli DH5 α	29
3.6	Transformationen.....	30
3.7	Transfektionen.....	30
3.7.1	Präzipitationsmethode.....	30
3.7.2	Lipidvesikel-basierte Methode.....	31
3.8	Reverse Transkription.....	31
3.9	Quantitative PCR.....	31
3.10	Sequenzierungen.....	32
3.11	Genotypisierungen.....	32
3.12	Somatic Cell Gene Targeting.....	32
3.12.1	Klonierung des Targeting-Konstruktes.....	33
3.12.2	Herstellung der Viruspartikel.....	35
3.12.3	Gewinnung und Charakterisierung eines Einzelklones.....	35
3.12.4	Primäre Infektion und Selektion.....	36
3.12.5	Sekundäre Infektion.....	37
3.13	Sensitivitätsassays.....	37
3.14	Proliferationsassays.....	38
3.15	Maximale Zelldichte.....	38
3.16	Alamarblau-Assays.....	38
3.17	Durchflusszytometrie.....	39
3.18	Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität.....	39
3.19	RNA-Interferenz.....	40
3.19.1	siRNA.....	40
3.19.2	shRNA.....	40
3.20	B-Raf Tiermodelle.....	41
3.20.1	Konditionaler BRAF-Knockin im ROSA26-Genlocus.....	41
3.20.2	Konditionaler BRAF-Knockin im Aktin-Genlocus.....	42
3.20.3	Transgenes Villin-BRAF-Modell.....	43
3.21	Alternatives Spleißen.....	44
3.22	Cdh1-Modell.....	45
3.22.1	Panethsche Zellen.....	45
3.22.2	Bakterielle Distribution.....	46
3.22.3	Charakterisierung eines chronischen Cdh1-Knockouts.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	BRAF-Targeting in RKO.....	47
4.1.1	Verifikation der parentalen Zellen.....	47
4.1.2	Isolierung und Expansion eines Subklones.....	47
4.1.3	Klonierung der Targeting-Konstrukte.....	47

4.1.4	Herstellung der Adeno-assoziierten Viren.....	48
4.1.5	Etablierung von Zelllinien.....	48
4.1.6	Integrität der BRAF-Allele.....	49
4.1.7	Funktionale Verifikation des Knockouts.....	49
4.2	Zellbiologische Phänotypen.....	50
4.2.1	Proliferation.....	50
4.2.2	Stoffwechsel.....	51
4.2.3	Seneszenz.....	52
4.2.4	Zellzyklus.....	53
4.3	Mechanismus Zelltod.....	53
4.3.1	Zelldichte-Effekte.....	55
4.4	Chemosensitivitäten.....	57
4.4.1	Klassische Chemotherapeutika.....	57
4.4.2	EGFR-Antikörper.....	58
4.4.3	B-Raf Inhibitoren.....	58
4.4.4	Spezifität der Inhibitoren.....	59
4.5	Verifikation des Phänotyps durch RNAi.....	61
4.5.1	BRAF-Knockdown durch siRNA.....	61
4.5.2	Konditionaler Knockdown durch shRNA.....	62
4.5.3	Zellzyklus unter RNA-Interferenz.....	63
4.6	B-Raf Tiermodelle.....	63
4.6.1	Konditionaler Knockin im ROSA26-Genlocus.....	63
4.6.2	Konditionaler Knockin im Aktin-Genlocus.....	64
4.6.3	Transgenes Villin-Modell.....	64
4.7	Alternatives Spleißen von BRAF in RKO.....	64
4.7.1	Relative Allelaktivität.....	66
4.7.2	Kinase-Aktivität der B-Raf Isoformen.....	66
4.8	E-Cadherin im Darm.....	67
4.8.1	Panethzellen.....	67
4.8.2	Bakterielle Invasion.....	68
4.8.3	Chronische Auswirkungen.....	69
5	Diskussion.....	71
5.1	B-RafV600E-Knockout in RKO.....	71
5.1.1	Auswahl eines biologischen Modellsystems.....	71
5.1.2	Auswahl der Methode zur Erzeugung eines Knockouts.....	71
5.1.3	Besondere Herausforderungen beim Somatic Cell Gene Targeting.....	73
5.1.4	Effizienz des Knockouts.....	74
5.1.5	Selektion gegen Wildtyp-Klone und Oncogene Addiction.....	75
5.2	Zellbiologische Phänotypen.....	76
5.2.1	Selbstversorgung mit Wachstumssignalen.....	76
5.2.2	Seneszenz.....	78
5.2.3	B-RafV600E-abhängige Apoptose-Resistenz.....	79

5.2.4	Kontaktinhibition.....	80
5.3	Therapeutische Optionen.....	82
5.4	Reproduktion des Knockout-Phänotyps durch RNAi.....	85
5.5	Tiermodelle.....	86
5.6	Spleißen.....	86
5.6.1	Neue BRAF-Spleißvarianten.....	86
5.6.2	Mechanistische Unterschiede im Spleißen von BRAF.....	87
5.7	Cdh1-Modell.....	88
6	Summary.....	91
6.1	V600E mutation of B-Raf.....	91
6.2	Alternative splicing of BRAF transcripts.....	91
6.3	E-Cadherin in intestinal homeostasis.....	91
7	Zusammenfassung.....	92
7.1	V600E-Mutation in B-Raf.....	92
7.2	Spleißen von BRAF-Transkripten.....	92
7.3	E-Cadherin in der intestinalen Homöostase.....	92
8	Danksagung.....	93
9	Materialien und Software.....	94
9.1	Puffer und Lösungen.....	94
9.2	Verbrauchsmaterial.....	96
9.3	Antikörper.....	97
9.4	Oligonukleotide.....	98
9.5	Software.....	99
9.6	Datenbanken.....	99
10	Verwendete Einheiten.....	100
11	Rechtlicher Hinweis.....	100
12	Abkürzungen.....	101

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung und Progression von Darmkrebs auf molekularer Ebene. Dabei werden die zu Grunde liegenden Mechanismen betrachtet und hinsichtlich ihres Potentials als Angriffspunkt für therapeutische Strategien untersucht. Im Einzelnen werden dabei drei verschiedene Ansätze verfolgt.

Um die Auswirkungen der V600E-Mutation in der Proteinkinase B-Raf auf verschiedene phänotypische Aspekte der Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein monoallelisches Knockout-Modell etabliert. Damit war es möglich, verschiedene Schlüsselkompetenzen maligner Zellen in B-Raf^{V600E} mutierten und korrespondierenden Wildtyp-Tumorzellen differenziell zu betrachten. Zudem erfolgte innerhalb dieses Modellsystems eine pharmakogenetische Charakterisierung, aus der wichtige Schlüsse für individualisierte Therapieansätze gezogen werden konnten.

Es wurde nach B-Raf Proteinisoformen gesucht, die durch alternatives Spleißen in kolorektalen Karzinomzellen entstehen. Durch die Quantifizierung und Charakterisierung dieser Isoformen wurden Hinweise auf eine mögliche physiologische Bedeutung gesammelt.

Schließlich wurde die Bedeutung des Strukturproteins E-Cadherin für die Integrität des Darmepithels und der Gewebearchitektur im Mausmodell untersucht und sowohl hinsichtlich morphologischer Effekte, als auch hinsichtlich der intestinalen Zelldifferenzierung ausgewertet. Dabei wurden neue Informationen zur Rolle von E-Cadherin bei entzündlichen Darmerkrankungen gewonnen, die einen starken Risikofaktor der kolorektalen Karzinogenese darstellen.

1.1 Krebs

Trotz enormer gesellschaftlicher Anstrengungen ist Krebs mit etwa 467 000 Neuerkrankungen pro Jahr (Stand 2008) in Deutschland eine häufige Krankheit¹. Damit stellt Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen zweithäufigste Todesursache dar². Mit Ausnahme weniger Tumorerkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden und die seit langem untersucht und vergleichsweise gut verstanden werden, gibt es dabei für die meisten Krebsarten vielfältige Risikofaktoren. Einige der bekanntesten Beispiele sind die Zusammenhänge zwischen Nikotininhalation und Lungenkrebs, zwischen UV-Licht Exposition und Melanomen, sowie zwischen entzündlichen Darmerkrankungen und der Entstehung kolorektaler Tumoren^{3 4}.

Zum grundlegenden Verständnis lässt sich die Karzinogenese in verschiedene Phasen einteilen. Während der Initiationsphase kommt es zur Bildung von Neoplasien, bei denen es sich in der Regel um Adenome handelt und oftmals entwickelt sich die Krankheit nicht über dieses gutartige Stadium hinaus⁵. Tritt der Tumor allerdings in die Progressionsphase ein, wächst er mit steigender Aggressivität und kann umliegendes Gewebe verdrängen. Dabei kann es zur Entwicklung eines mesenchymalen Phänotyps kommen, mit dem die Tumorzellen physiologische Barrieren zwischen unterschiedlichen Geweben

überwinden können und invasiv werden. Diese Kompetenz ermöglicht schließlich auch die Ausbildung von Metastasen, die über die Blutgefäße und das Lymphsystem im Körper gestreut werden können.

Je nach Ursprungsgewebe und individuellem Ablauf der Krankheit auf molekularer Ebene können verschiedene Ereignisse für den Übergang zwischen den Karzinogenese-Stadien verantwortlich sein. Selbst innerhalb einer physiologischen Entität können grundlegend unterschiedliche Mechanismen in individuellen Kombinationen der Tumorentstehung zu Grunde liegen. Je heterogener eine Patientenpopulation hinsichtlich dieser molekularen Ereignisse ist, desto geringer ist oft der Anteil der Patienten, die auf eine einzelne Therapieoption ansprechen.

1.2 Darmkrebs

Das kolorektale Karzinom ist eine Krebserkrankung mit besonders häufiger Diagnose (66 800 Fälle pro Jahr in Deutschland, Stand 2008) und mit einer in molekularer Hinsicht heterogenen Patientenpopulation. Darmkrebs war in 2008 für 14,3 % der Krebs-Neuerkrankungen und 12,1 % der krebsbedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Dabei sinken mit fortschreitendem Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose die 5-Jahres-Überlebensraten rapide (Tabelle 1). Neben verschiedenen Varianten erblicher Prädispositionen spielen vielfältige Risikofaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Darmkrebs. Wichtige Faktoren liegen in den Ernährungs- und Lebensgewohnheiten der Patienten, aber auch in Vorerkrankungen. Ein besonders relevantes Beispiel für den Zusammenhang zwischen Inflammation und Krebs ist die Prädisposition für das kolorektale Karzinom durch chronische Darmentzündungen wie z.B. Morbus Crohn⁶.

Stadium	USA ⁷	Australien ⁸	Großbritannien ⁹
I/A	93 %	90 %	93,2 %
II/B	72 % bis 85 %	87 %	77,0 %
III/C	44 % bis 83 %	57 %	47,7 %
IV/D	8 %	(keine Daten)	6,6 %

Tabelle 1: 5-Jahres Überlebensraten von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach UICC/AJCC- oder Dukes-Stadium. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Überlebensrate der Darmkrebs-Patienten sinkt, je weiter der Krankheitsverlauf bei Erstdiagnose fortgeschritten ist. Im jeweils frühesten Tumorstadium (grün) überlebt die große Mehrheit der Patienten länger als fünf Jahre. Dagegen hat sich das Verhältnis überlebender zu verstorbenen Patienten im spätesten Stadium (rot) in etwa invertiert. Demnach lassen sich fortgeschrittene kolorektale Karzinome nur sehr schwer therapieren.

1.3 Optionen in der Tumorthherapie

Um die Auswertung und Interpretation pharmakogenetischer Daten in dieser Arbeit zu erleichtern soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die therapeutischen Optionen gegeben werden. Die Auswahl der dabei vorgestellten Wirkstoffe richtet sich primär nach deren Relevanz für die vorliegende Arbeit und weniger nach deren klinischem Einsatz bei der Behandlung kolorektaler Karzinome.

In der Onkologie steht eine große Anzahl an Substanzen zur Verfügung, die oft in ungerichtete und zielgerichtete Wirkstoffe unterteilt werden. Diese Einteilung bezieht sich auf den Wirkmechanismus moderner Inhibitoren und Antikörper, die ein einzelnes *Target* in einem bestimmten Signalweg angreifen. Dennoch haben auch konventionelle Chemotherapeutika einen zielgerichteten Wirkmechanismus, der jedoch meist weniger vom zu behandelnden Tumortyp und der betroffenen Gewebeart abhängt.

Etoposid

Zum einen verhindert Etoposid durch eine Topoisomerase II-Inhibition die lokale Entwindung der superhelikalen DNA-Struktur im Rahmen von Transkription und Replikation, wodurch die Zellteilung blockiert wird. Zum anderen verursacht der Wirkstoff Brüche in einzel- und doppelsträngiger DNA. Als Konsequenz des Zellzyklusarrestes und der DNA-Schädigung werden Apoptose-Mechanismen in der Zelle aktiviert.

Irinotecan

Irinotecan ist ein Topoisomerase I-Hemmer. Die Entwindung der Chromatinstruktur zum Ablesen der DNA durch Topoisomerase II ist nur möglich, wenn die auftretenden Überspannungskräfte (positives *Supercoiling*) durch kontrollierte Strangbrüche reversibel aufgefangen werden. Durch die Inhibition der Typ I-Topoisomerasen kann diese Reaktion verhindert werden. Die DNA kann in der Folge nicht ausreichend freigelegt werden, sodass der Zellzyklus unterbrochen wird.

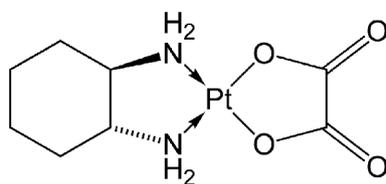
Paclitaxel

Paclitaxel ist der älteste etablierte Wirkstoff aus der Gruppe der Taxane. Es bindet an β -Tubulin, blockiert den Abbau von Mikrotubuli und inhibiert so u.a. den Spindelapparat. Dadurch wird die strukturelle Organisation der Zellteilung verhindert, der Zellzyklus arretiert und Apoptose induziert.

Mitomycin C

Aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* isoliert und zunächst als Antibiotikum eingesetzt, interkaliert Mitomycin C in DNA-Doppelstränge. In der Folge werden die DNA-Stränge kovalent miteinander verbunden und können von der Zelle weder für die Transkription, noch zur DNA-Synthese im Rahmen der Zellteilung aufgetrennt werden.

Oxaliplatin



Oxaliplatin

Abbildung 1: Oxaliplatin Lewis-Strukturformel für Oxaliplatin mit Komplexierung durch den DACH-Liganden.

Platin wird in Form verschiedener Komplexe als Zytostatikum eingesetzt. Im Oxaliplatin ist das Metallion von einem Oxalat und dem sogenannten DACH-Liganden (1,2-Diaminocyclohexan) tetraedrisch komplexiert (Abbildung 1). Nach der Hydrolyse des Komplexes greift das zweifach positiv geladene Platin nukleophile Zentren in der DNA an. Es initiiert sowohl intra- und intermolekulare *Crosslinks* der DNA-Stränge, als auch kovalente Bindungen der DNA mit anderen zellulären Molekülen.

5-Fluoruracil

5-Fluoruracil (5-FU) ist ein nicht physiologisches Basenanalogen und wird aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit von der Zelle anstelle der natürlichen Basen Cytosin, Thymin oder Uracil in Nucleotide integriert (Abbildung 2). Im Rahmen von Genexpression und Zellteilung werden diese als Bausteine in DNA und RNA inkorporiert und verursachen Fehler in der betreffenden DNA-Sequenz. Darüber hinaus werden die Thymidylat-Synthase und der Exosomkomplex durch 5-FU inhibiert, was zusätzlich den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Zelle stört. Die Beeinträchtigung der Transkription hat im Wesentlichen ein verlangsamtes Zellwachstum zur Folge, während die weiteren Mechanismen den Zellzyklus in der Interphase arretieren lassen.

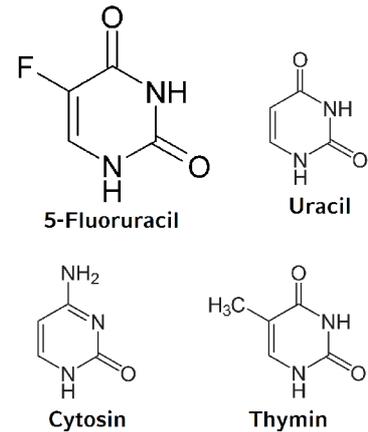


Abbildung 2: 5-FU und analoge Basen. 5-Fluoruracil ist den physiologischen Basen Cytosin, Thymin und Uracil chemisch ähnlich.

Folinsäure

Das biologisch aktive Enantiomer der Folinsäure ist die L-Folinsäure oder Levofolinsäure. Über eine Inhibition der Thymidylat-Synthase wird die Verfügbarkeit von Thymidin-Nucleotiden begrenzt. Dadurch beeinträchtigt Folinsäure die DNA-Synthese und -Reparatur und verstärkt die zytostatische Wirkung von 5-FU in der Kombinationstherapie.

Kombinierte Therapie

Zur Erhöhung der Wirksamkeit werden die vorhandenen tumorwirksamen Substanzen in verschiedenen Kombinationen und aufeinander folgenden Regimen eingesetzt. In den etablierten FOLFOX- und FOLFIRI-Protokollen werden dabei Folinsäure, 5-Fluoruracil und Oxaliplatin bzw. Irinotecan periodisch über mehrere Woche verabreicht.

Sorafenib

Als oral verfügbarer *Small Molecule Inhibitor* hat Sorafenib mehrere Zielmoleküle in verschiedenen zellulären Signalwegen. Ein genaues Reaktionsprofil ist für diesen Multikinaseinhibitor nicht bekannt. In erster Linie wird aber die Signaltransduktion für zelluläres Wachstum und Proliferation beeinflusst, wie der EGF (*Epidermal Growth Factor*)- und der VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)-Signalweg. Sorafenib war lange Zeit der einzige klinisch etablierte Inhibitor der B-Raf Kinase und wurde trotz des relativ unspezifischen Interaktionsspektrums auch für *in vitro* Untersuchungen der MAPK-Signalwege eingesetzt.

Spezifische Inhibitoren

Seit der Entwicklung von Sorafenib wurden viele weitere inhibitorische Wirkstoffe erforscht, deren Spezifität für ein einzelnes Zielmolekül maximiert wurde. Ein Schwerpunkt waren dabei Effektorinasen in zellulären Signalwegen, die oft eine *Oncogene Addiction* hervorrufen können (siehe Kapitel 1.4.7). Durch die zunehmend erforschte Bedeutung des MAPK-Signalweges in verschiedenen Krebstypen wurden auch Inhibitoren gegen die Effektorinasen unterhalb des EGF-Rezeptors entwickelt. Obwohl dabei mit der Entwicklung von Substanzen gegen Ras-Kinasen besonders früh begonnen, konnte sich keiner der

Kandidaten für die klinische Anwendung qualifizieren¹⁰. Seit einiger Zeit werden verstärkt zielgerichtete Inhibitoren gegen B-Raf und seine mutierten Varianten entwickelt. Mit Vemurafenib wurde in 2011 bereits der erste B-Raf Inhibitor einer neuen Generation für Melanom-Patienten zugelassen. Vemurafenib weist dabei eine hohe Spezifität für die V600E-mutierte Variante des B-Raf Proteins auf, zeigt aber andererseits eine Aktivierung des Signals in Wildtyp-Zellen^{11 12}. Mit RAF265 und GSK2118436 stehen weitere Kandidaten in den *Pipelines* der pharmazeutischen Unternehmen deren Zulassung in nächster Zeit erwartet wird^{13 14}.

Monoklonale Antikörper

Die physiologischen Funktionen von Rezeptoren und anderen Molekülen der Signaltransduktion können mit Hilfe von Antikörpern hochselektiv blockiert werden. Erste Versuche der therapeutischen Nutzung von Antikörpern schlugen jedoch fehl, da die verwendeten murinen Antikörper selbst als Antigen erkannt und vom Immunsystem des Patienten weitgehend neutralisiert wurden. So wurde der erste für das kolorektale Karzinom zugelassene Antikörper, das vollständig murine Edrecolomab, nach wenigen Jahren vom Markt genommen¹⁵. Erst durch neue Technologien gelang die Herstellung humanisierter und vollständig humaner Antikörper (Abbildung 3). Ein besonders erfolgreiches Beispiel ist Bevacizumab, der VEGF bindet und die Bildung von Blutgefäßen verhindern oder reduzieren kann¹⁶. Damit wirkt Bevacizumab nicht direkt gegen Krebszellen, führt aber zu einer Stagnation des Tumorwachstums, indem die Nährstoffversorgung begrenzt wird.

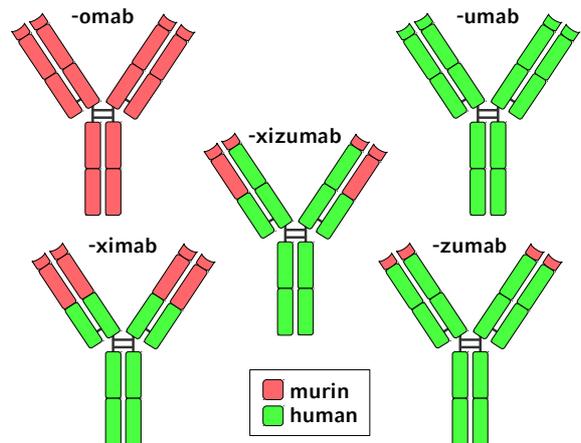


Abbildung 3: Schematische Darstellung muriner, humanisierter und humaner Antikörper. Die Nomenklatur therapeutisch eingesetzter Antikörper richtet sich nach dem Anteil humaner Domänen. Anstatt muriner Antikörper werden humanisierte oder vollständig humane Antikörper erfolgreich in der Therapie eingesetzt.

1.4 Merkmale einer Krebserkrankung

Im Rahmen dieser Arbeit werden die onkogenen Merkmale von Tumorzellen in unterschiedlichen Modellsystemen untersucht. Einleitend dazu sollen hier die zentralen Charakteristika der Onkogenität vorgestellt werden, auf denen bei der Analyse und Interpretation der experimentellen Daten das Hauptaugenmerk lag.

1.4.1 Das Hanahan-Weinberg-Modell

Trotz der Vielfältigkeit von Krebserkrankungen auf molekularer Ebene lassen sich einige gemeinsame Eigenschaften in allen Tumorzellen finden. Das Modell von Hanahan und Weinberg beschreibt sechs grundlegende Kompetenzen, mit denen der Phänotyp einer Krebszelle beschrieben werden kann¹⁷:

- Krebszellen versorgen sich selbst mit Wachstumssignalen.
- Sie sind unempfindlich auf Signale zur Inhibition der Proliferation.
- Krebszellen sind resistent gegen Zelltod.
- Sie stimulieren zur eigenen Versorgung die Angiogenese.
- Die Zellen können sich unbegrenzt oft teilen.
- Sie dringen in umliegendes Gewebe ein und metastasieren.

In einer Neuauflage dieses Modells haben die Autoren die Liste der zentralen Merkmale einer vollständig entarteten Krebszelle um vier zusätzliche Punkte erweitert¹⁸:

- Krebszellen weisen einen abnormalen Stoffwechsel auf.
- Sie können die Mechanismen des Immunsystems umgehen.
- Sie zeigen chromosomale Abnormalitäten oder DNA-Instabilität.
- Krebszellen weisen Entzündungsprozesse auf und profitierten von diesen.

Dabei ist es von untergeordneter Rolle, über welchen Signalweg oder welche Kombination aus untergeordneten Effekten die einzelnen Kompetenzen erworben werden. Allein für die Beeinflussung des Zellzyklus, der für die drei erstgenannten Kompetenzen eine entscheidende Rolle spielt, schlagen die Autoren ein Netzwerk aus mindestens zehn zellulären Signalwegen vor.

Bereits im ursprünglichen Hanahan-Weinberg-Modell ist die Reihenfolge der sechs zentralen Kompetenzen nicht vollständig beliebig, sondern folgt einer von zunächst fünf vorgeschlagenen Sequenzen. Dabei scheinen diese möglichen Wege der Kanzerogenese durchaus mit dem klassischen Sequenzmodell aus Initiation, Progression und Metastasierung vereinbar. Die meisten Eigenschaften können dazu entweder als frühe oder späte Ereignisse interpretiert werden. So ist allen postulierten Kompetenz-Sequenzen gemein, dass die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen und Apoptoseresistenz am Anfang stehen, während unbegrenzte Replikation und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung erst spät erworben werden.

Besonders deutlich werden die Gemeinsamkeiten der verschiedenen Modelle, wenn man berücksichtigt, dass die überwiegende Anzahl der von Hanahan und Weinberg beschriebenen Kompetenzen auch auf gutartige Tumoren zutreffen. Von den sechs initial genannten Merkmalen ist sogar nur die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit per Definition exklusiv bei Karzinomen zu finden¹⁹. Diese große Übereinstimmung zwischen benignen und malignen Tumormerkmalen steht eindeutig im Einklang mit der Vorstellung einer Adenom-Karzinom-Sequenz.

Im Folgenden soll auf einzelne Kompetenzen von Krebszellen näher eingegangen werden.

1.4.2 Resistenz gegen Zelltod

Zelltod kann in verschiedenen Formen auftreten und läuft entweder von der zellulären Programmierung

weitgehend kontrolliert ab, oder wird der Zelle von äußeren Bedingungen aufgezwungen. In der Regel sind Krebszellen für die verschiedenen Zelltod-induzierenden Mechanismen deutlich weniger sensibel als normale Zellen²⁰.

Als Apoptose oder physiologischen Zelltod bezeichnet man Prozesse, mit denen Zellen auf äußere Bedingungen (extrinsischer Weg) oder innere Einflüsse (intrinsische Apoptose) reagieren. Die extrinsische Variante wird durch Zellkontakte mit Immunzellen oder über die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren vermittelt. Intrinsische Apoptose wird dagegen durch oxidativen Stress oder umfangreiche Schädigungen des Erbgutes ausgelöst. Der Zelltod wird im Rahmen der Apoptose von der Zelle selbst veranlasst und wird mechanistisch im Wesentlichen über Caspase-Kaskaden gesteuert. Allen dieser Kaskaden ist die Rekrutierung der Caspase 3 gemeinsam, die dabei durch Spaltung in ihre aktivierte Form überführt wird. Der Nachweis gespaltener Caspase 3 gilt daher als mechanistischer Beleg einer Apoptose-Programmierung.

Das fremdbestimmte Analogon zur Apoptose ist die Nekrose, die auch als pathologischer Zelltod bezeichnet wird. Sie kann u.a. durch Verletzungen, Entzündungen oder Gifte ausgelöst werden und wird im Gegensatz zur Apoptose nicht durch endogene Mechanismen kontrolliert. Apoptose und Nekrose treten im Experiment häufig gemeinsam in unterschiedlichen Ausmaßen auf und können nur schwer voneinander unterschieden werden. Allerdings wird im Rahmen der Nekrose vor der Zellyse zunächst eine Zunahme des Zellvolumens beobachtet, die bei apoptotischen Zellen in dieser Form nicht auftritt.

1.4.3 Selbstversorgung mit Wachstumssignalen

Die meisten kultivierten Zellen werden durch Wachstumsfaktoren aus fetalem bovinem Serum (FBS) zur Proliferation angeregt. Tatsächlich sind viele Krebszellen aber weitgehend unempfindlich gegen eine eingeschränkte Versorgung mit Serum. Um die physiologischen Mechanismen zur Proliferationskontrolle zu umgehen, haben diese Zellen die Kompetenz erworben, sich selbst mit Wachstumssignalen zu stimulieren²¹. Diese Unabhängigkeit von äußeren Faktoren wird meistens durch hyperaktivierte Signalwege erreicht, die in der Regel wiederum auf Punktmutationen, genetischer Instabilität oder epigenetischen Veränderungen beruhen.

1.4.4 Resistenz gegen Inhibition der Proliferation

Tumorzellen können physiologische Mechanismen zur Kontrolle der Proliferation in Normalgewebe auf verschiedene Art und Weise umgehen²². Ein Beispiel für einen solchen Kontrollmechanismus ist die Kontaktinhibition²³. Im homöostatischen Gleichgewicht wird die Zellteilung bei einem engen Kontakt mit Nachbarzellen verlangsamt oder eingestellt. Dies ist nicht nur für die Aufrechterhaltung des umliegenden Gewebes nötig, sondern oft essentiell für die Versorgung und die physiologische Funktion der Zellen.

1.4.5 Entzündung

In der Mikroumgebung von Tumoren werden Proliferation und Zellmigration durch entzündliche Prozesse stimuliert. Darüber hinaus benutzen Krebszellen Selektine, Chemokine und deren Rezeptoren zur Invasion, Migration und Metastasierung²⁴. Nachdem Tumorzellen also inflammatorische Mechanismen rekrutieren, verwundert es nicht, dass chronische Entzündungen einen starken Risikofaktor für Krebs darstellen. Etwa 15 % aller bösartiger Tumoren entstehen aus Entzündungen²⁵.

1.4.6 Invasivität und Metastasierung

Zur Überwindung physiologischer Barrieren zwischen verschiedenen Gewebearten nehmen ursprünglich epitheliale Krebszellen einen mesenchymalen Phänotyp an²⁶. Zu den davon betroffenen Eigenschaften gehört vor allem eine Polarisierung der Zelle, mit der das Epithelgewebe den Kontakt zur Basalmembran herstellt. Krebszellen verlieren die Polarisierung, regulieren Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunter und lösen die Zellkontakte²⁷. Dieser Vorgang wird als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet.

1.4.7 Redundanz und *Oncogene Addiction*

Ein weiteres Phänomen, das in vielen Krebszellen auftritt, ist die große Abhängigkeit des Phänotyps von einzelnen molekularen Ereignissen. In zellulären Prozessen, allen voran in der Signaltransduktion, bestehen häufig redundante Systeme nebeneinander. Die meisten Enzyme erkennen mehrere Substrate und oft können einzelne Reaktionen von unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden²⁸. Fällt in einem Signalweg ein Baustein aus, kann die Funktion von anderen Molekülen übernommen werden. Der Ausfall einer ganzen Signalkaskade kann in vielen Fällen über alternative Signalwege wenigstens teilweise aufgefangen werden, sodass die Signaltransduktion nicht unter ein physiologisches Minimum sinkt. Krebszellen verfügen für viele ihrer hyperaktivierten Signalkaskaden nicht über eine solche Redundanz, sondern zeigen eine funktionale Abhängigkeit von bestimmten Schlüsselgenen. Sind für die Zelle lebenswichtige Funktionen von dieser Abhängigkeit betroffen, spricht man von einer *Oncogene Addiction*²⁹.

Diese Bezeichnung ist insoweit irreführend, als dass dabei nicht immer die Aktivierung eines Onkogens zu Grunde liegen muss, sondern auch ein Tumor supprimierender Mechanismus inaktiviert werden kann. Da diese Eigenschaft nicht in allen Krebszellen zu beobachten ist, wurde sie nicht in den Kanon von Hanahan und Weinberg aufgenommen.

1.5 Modelle der kolorektalen Karzinogenese

Im Rahmen der zwei wichtigsten Modellvorstellungen für die Entwicklung kolorektaler Karzinome wird die Bedeutung einzelner onkogener Merkmale für die kolorektale Karzinogenese beschrieben. Dabei können durch statistische Korrelationen und pathologische Erfahrung oft klinische Beobachtungen und molekulare Ereignisse zueinander in Beziehung gesetzt werden. Eine solche Zuordnung ermöglicht die Beurteilung einzelner Moleküle wie B-Raf oder E-Cadherin hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Zielstrukturen.

1.5.1 Das Vogelstein-Modell

Die Entstehung von Darmkrebs verläuft in der Regel über einen langen Zeitraum. Im Gegensatz zu den meisten anderen Krebsentitäten kann die Entwicklung von Tumoren im Darm mit Hilfe der Koloskopie relativ gut beobachtet werden. Diese Umstände führten früh zu einer konkreten Modellvorstellung der kolorektalen Karzinogenese. In einem von Bert Vogelstein Ende der 1980er Jahre beschriebenen Modell entwickelt sich Darmkrebs stufenweise durch die Akkumulation genetischer Mutationen in einer einzelnen Zelle und durchläuft dabei eine Adenom-Karzinom-Sequenz (Abbildung 4)^{30 31 32}. Nachdem man zunächst von einer weitgehend beliebigen Reihenfolge der postulierten vier bis fünf onkogenen Mutationen ausging, wurde in weiterentwickelten Versionen dieses Modells zwischen frühen und späten Mutationsereignissen unterschieden³³. In frühen und mittleren Stadien sind verstärkte Proliferation, eine beeinträchtigte DNA-Reparatur, die Überwindung zellulärer Seneszenzmechanismen, Apoptoseresistenz und Vaskulogenese die zentralen Kompetenzen, die der Tumor durch Mutationen an bestimmten Stellen der verantwortlichen Signalwege erwirbt. Im Weiteren kann das tumoröse Gewebe eine erhöhte Invasivität durch Veränderung der Zell-Zell-Interaktion und schließlich die Fähigkeit zur Migration und Metastasierung erwerben.

Zunehmend wurde das Modell erweitert, z.B. indem Defekte in verschiedenen Enzymen der DNA-Reparatur als alternative Ereignisse zur p53-Mutation aufgenommen wurden³⁴. Mit der zunehmenden Entdeckung epigenetischer Mechanismen wurde die Defini-

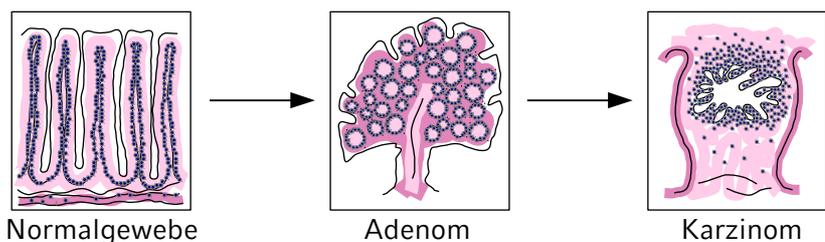


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vogelstein-Modells zur kolorektalen Karzinogenese. Nach Vogelstein basiert die Krebsentstehung im Darm auf einer Adenom-Karzinom-Sequenz.

tion eines Ereignisses oder *Hits* erweitert und blieb nicht mehr auf genetische Mutationen beschränkt. Die grundlegende Einsicht, dass Darmkrebs auf bestimmten molekularen Schlüsselereignissen beruht, die sequenziell in einer entartenden Zelle akkumulieren, blieb dabei jedoch stets erhalten. Dieses Prinzip wurde in der Folge auch auf weitere Krebserkrankungen übertragen.

Das Modell beschreibt nicht nur die Karzinogenese auf molekularer Ebene, sondern kann auch zur Erklärung von klinischen Beobachtungen herangezogen werden. Bei Neoplasien, die im Rahmen regelmäßiger Vorsorge-Koloskopien entdeckt und entfernt werden, handelt es sich mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit um Tumoren in früheren Stadien³⁵. Maligne Kompetenzen liegen hier nur begrenzt vor, was die vollständige Heilung oder zumindest eine langfristige Kontrolle der Krankheit durch Polypektomien oder chirurgische Eingriffe ermöglicht. Dementsprechend treten Erstdiagnosen in fortgeschrittenen Stadien häufig bei Patienten auf, die nicht regelmäßig, sondern erst aufgrund deutlicher Symptome eine Koloskopie vornehmen lassen. Die schlechtere Prognose dieser Patienten kann im Vogelstein-Modell vor allem durch zwei Zusammenhänge erklärt werden. Zum einen ist hier die vollständige Resektion des Primärtumors durch eine hohe Infiltration der umliegenden Gewebeschichten oft nicht mehr möglich, oder es ist bereits zur Bildung von Metastasen gekommen. Zum anderen weisen viele fortgeschrittene Tumoren eine

Mehrfachresistenz (*Multiple Drug Resistance*) auf, also eine Resistenz gegen gleich mehrere in der Klinik etablierte Wirkstoffe, für die weitere Mutationen verantwortlich gemacht werden.

Das Vogelstein-Modell betont vor allem die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Entstehung von Darmkrebs. Inaktivierung des Tumorsuppressors APC und deregulierte Proteinspiegel von β -Catenin stellen zentrale Mechanismen der Tumorgenese in vielen Darmkrebs-Patienten dar. Damit ist das Wnt-*Signaling* der klassische und vermutlich am besten untersuchte Signalweg im kolorektalen Karzinom. Da in der vorliegenden Arbeit nur vereinzelt auf diesen Signalweg eingegangen wird, soll an dieser Stelle keine detaillierte Besprechung erfolgen, sondern auf zusammenfassende Literatur und auf die Wnt-Homepage von Roel Nusse verwiesen werden^{36 37 38}.

1.5.2 Das Jass-Modell

Das bislang jüngste Modell zur kolorektalen Krebsentstehung wurde von J. R. Jass an der McGill University entwickelt und dient vor allem der Klassifikation der Tumoren hinsichtlich einer optimalen Behandlung^{39 40}. Als Pathologe trug Jass insbesondere der pathologischen Erfahrung Rechnung, dass bestimmte molekulare Ereignisse im kolorektalen Karzinom häufig gemeinsam auftreten. Daraus wurde gefolgert, dass die Kanzerogenese zwar auf verschiedenen Wegen erfolgen kann, dass diesen Pathways aber in der Regel bestimmte Grundstrukturen zu Grunde liegen. Das Modell basierte ursprünglich auf nur zwei molekularen Markern zur Klassifizierung der Tumoren in mindestens fünf Subpopulationen. Auch in den folgenden Modellvarianten und -weiterentwicklungen wird im Vergleich zu anderen Modellen immer nur mit relativ wenigen molekularen Markern gearbeitet (Abbildung 5). Die wichtigsten und am häufigsten verwendeten Marker sind Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) und der CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP).

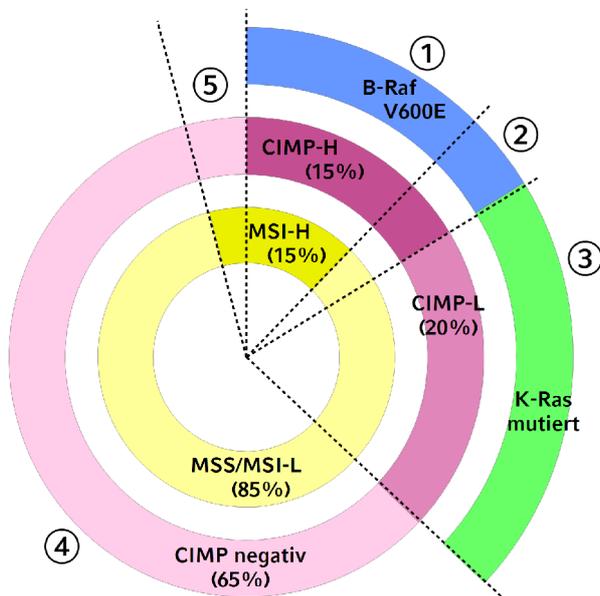


Abbildung 5: Einteilung kolorektaler Karzinome anhand molekularer Klassifikatoren nach Jass. Verschiedene molekulare Marker korrelieren in kolorektalen Tumorproben. Eine V600E-Mutation in B-Raf geht in der Regel mit einer hohen Promoter-Methylierung und einem Mikrosatelliten-instabilen Phänotyp einher.

Als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet man Abweichungen in der Länge repetitiver Sequenzen bei der DNA-Replikation⁴¹. Dabei werden je nach Konvention sechs bis zehn Regionen mit repetitiven Elementen analysiert. Nach der relativen Anzahl der veränderten Lozi wird zwischen *MSI-high*, *MSI-low* und *MSS* (Mikrosatelliten-stabil) unterschieden⁴². Die MSI-Phänotypen werden in der Regel durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur (z.B. Defekte im *MLH1*-Gen) hervorgerufen. MSI deutet auf eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Mutationen hin, wie sie in sequenziellen Kanzerogenese-Modellen für die Initiationsphase postuliert wird.

Als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet man Abweichungen in der Länge repetitiver Sequenzen bei der DNA-Replikation⁴¹. Dabei werden je nach Konvention sechs bis zehn Regionen mit repetitiven Elementen analysiert. Nach der relativen Anzahl der veränderten Lozi wird zwischen *MSI-high*, *MSI-low* und *MSS* (Mikrosatelliten-stabil) unterschieden⁴². Die MSI-Phänotypen werden in der Regel durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur (z.B. Defekte im *MLH1*-Gen) hervorgerufen. MSI deutet auf eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Mutationen hin, wie sie in sequenziellen Kanzerogenese-Modellen für die Initiationsphase postuliert wird.

CpG-Inseln sind Abschnitte in eukaryontischen Promotorsequenzen, die mehrere hundert bis wenige tausend Basenpaare lang sein können und einen überdurchschnittlichen Anteil an Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotiden aufweisen. Die Cytidin-Reste in beliebigen CpG-Dinukleotiden des menschlichen Genoms liegen überwiegend methyliert vor. Nur in den CpG-Inseln der Promotorregionen kann diese Methylierung dauerhaft unterdrückt werden. Promotoren mit einem dennoch hohen Anteil methylierter CpG-Inseln führen in der Regel dazu, dass die entsprechenden Gene nur noch sehr schwach exprimiert werden (*Gene Silencing*). Zur Bestimmung des CIMP-Status hat sich das Markerpanel von Weisenberger *et al.* weitgehend durchgesetzt, bei dem die Promotoren der Gene *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* und *SOCS1* auf CpG-Methylierung untersucht werden⁴³. Dabei wird je nach Anteil der inaktivierten Promotor zwischen CIMP-*high*, CIMP-*low* und CIMP-*negative* unterschieden.

Im Jass-Modell wird berücksichtigt, dass einige wichtige molekulare Marker des kolorektalen Karzinoms miteinander korrelieren. So kommt CIMP-*low* fast ausschließlich in Kombination mit MSS oder MSI-*low* vor. Zudem findet sich in diesen Tumoren regelmäßig eine Mutation des *KRAS*-Gens. Dagegen korreliert CIMP-*high* mit einer Mutation des *BRAF*-Gens, kann aber sowohl als MSI-*high*, als auch als moderater oder negativer MSI-Phänotyp vorliegen. Auf dieser Grundlage und zusammen mit klinischen Erfahrungen und morphologischen Beobachtungen führte Jass die folgende Klassifikation ein (siehe Abbildung 5)⁴⁰:

- Typ 1: CIMP-*high* und MSI-*high*, assoziiert mit *BRAF*-Mutation
- Typ 2: CIMP-*high* und MSS/MSI-*low*, assoziiert mit *BRAF*-Mutation
- Typ 3: CIMP-*low* und MSS/MSI-*low*, assoziiert mit *KRAS*-Mutation
- Typ 4: CIMP-*negative* und MSS
- Typ 5: CIMP-*negative* und MSI-*high*

Dabei entstehen Typ 1 und Typ 2 aus Vorstufen mit serratierter Morphologie, während Typ 4 und Typ 5 einer Adenom-Karzinom-Sequenz mit zumeist tubulärer Morphologie entspringen.

Auch das Jass-Modell wurde modifiziert und weiterentwickelt, insbesondere durch die Annahme, dass genetische Instabilität eine Grundvoraussetzung für die Karzinogenese ist. Sporadische kolorektale Karzinome be-

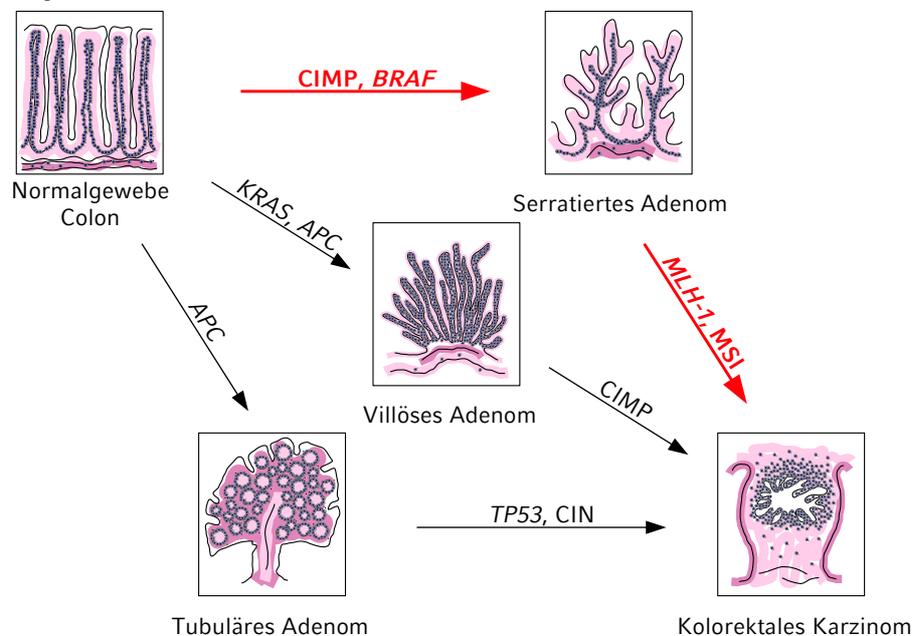


Abbildung 6: Die kolorektale Karzinogenese kann auf verschiedenen Wegen verlaufen. Molekulare Ereignisse korrelieren in der kolorektalen Karzinogenese sowohl miteinander, als auch mit der Morphologie adenomatöser Zwischenstufen. Dabei wird zwischen mindestens drei solcher Entstehungswege unterschieden. In dieser Arbeit ist vor allem der *BRAF*-vermittelte Kanzerogenese-Weg (rote Pfeile) von Bedeutung.

sitzen demnach entweder einen MSI-Phänotyp oder zeigen chromosomale Instabilität (CIN)⁴⁴. Um dieses Konzept erweitert und auf nicht-erbliche Fälle beschränkt, lässt sich das Modell zu einem dreigliedrigen Ansatz vereinfachen (Abbildung 6).

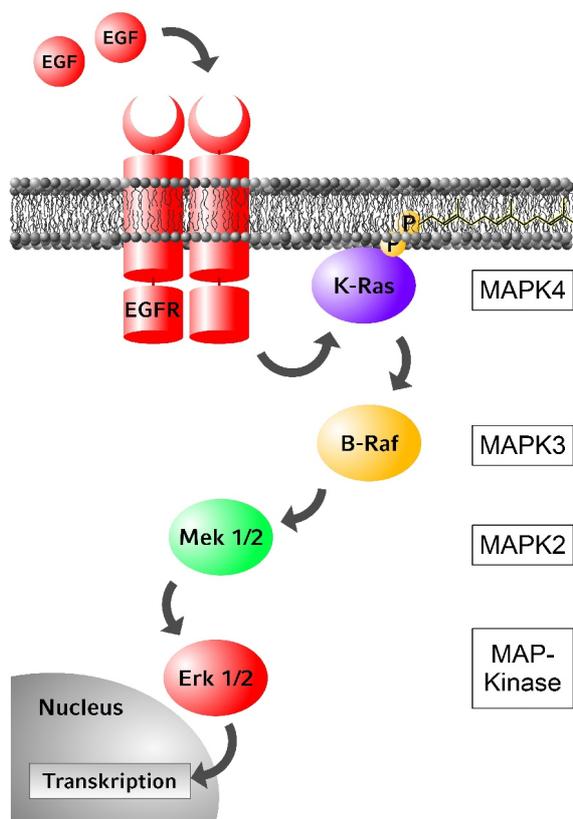
Folglich kann spätestens seit der Publikation des Jass-Modells Darmkrebs als ein Sammelbegriff für bis zu fünf verschiedene molekulare Entitäten verstanden werden, deren Entstehungswege sich teilweise sehr scharf voneinander abgrenzen lassen. Physiologisch im gleichen Organ, handelt es sich somit um verschiedene molekulare Entitäten.

1.6 Zelluläre Signalwege

Um die Interpretation der experimentellen Daten zum BRAF-Modell in dieser Arbeit zu erleichtern, soll im folgenden auf die zugehörigen zellulären Effektorkaskaden des MAPK-Signalwegs eingegangen werden.

1.6.1 Der MAP-Kinase Signalweg

Bereits im Vogelstein-Modell wird der Stellenwert des MAPK-Signalwegs für die kolorektale Karzinogenese beschrieben. In den Arbeiten von Jass spielt dieser Signalweg eine zentrale Rolle zur Unterscheidung der Darmkrebs-Subtypen. Die MAPK-Signaltransduktion ist vergleichsweise umfangreich erforscht und lässt



sich in drei Teilbereiche gliedern, die weitgehend parallel zueinander angeordnet sind. Im Rahmen des kolorektalen Karzinoms ist dabei im Wesentlichen eine Hyperaktivierung der eigentlichen Mitogen-aktivierten Kaskade von Bedeutung. Alternative Signalkaskaden über p38 oder JNK (c-Jun N-terminale Kinase) sind ebenfalls gut untersucht, spielen jedoch bei der Darmkrebsentstehung eine untergeordnete Rolle.

Die Mitogen-aktivierte Kaskade wird nach ihren Effektor-kinasen auch Ras/Raf/Mek/Erk-Kaskade genannt (Abbildung 7). Mit ihr reagiert die Zelle auf die Bindung extrazellulärer Signale an die entsprechenden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Neben dem EGF-Rezeptor kann diese Kaskade vom PDGF-, FGF- und den Trk-Rezeptoren aktiviert werden. Nach der Bindung des Liganden dimerisieren die Rezeptoren und rekrutieren verschiedene Ko-faktoren an die Membran, woraufhin Ras durch Phosphorylierung aktiviert wird. Die Effektoren der Ras-Familie sind kleine GTPasen, die über einen Farnesyl-Anker an die Membran gebunden sind.

Abbildung 7: Die Ras/Raf/Mek/Erk-Kaskade im MAPK-Signalweg. Die sogenannte Mitogen-aktivierte Kaskade beginnt mit den membranständigen Ras-Kinasen, und verläuft im Weiteren zytosolisch über Raf, Mek 1/2 und Erk 1/2.

Unterhalb der Ras-Kinasen verläuft die Kaskade zytosolisch indem zunächst die Serin/Threonin-Kinasen der Raf-Familie phosphoryliert werden. Deren einzige bekannte Substrate sind die MAPK-Kinasen Mek 1 und Mek 2, die wiederum die eigentlichen MAP-Kinasen der Erk-Proteinfamilie aktivieren. Einerseits werden durch Erk 1/2 bereits im Zytosol Transkriptions- und Translationsfaktoren aktiviert. Andererseits transloziert die phosphorylierte Kinase selbst in den Nukleus, um dort ein umfangreiches Netzwerk von Faktoren zu aktivieren. Durch das spezifische Profil der regulierten Gene wirkt sich eine Erk-Aktivierung hauptsächlich auf die Proliferation und Differenzierung einer Zelle aus.

1.6.2 Hyperaktivierung des MAPK-Signalweges

Eine Sensitivierung auf mitogene Signale kann von einer Zelle durch eine temporär verstärkte Expression des EGFR-Gens erreicht werden. Dieser Vorgang wird von der Zelle genutzt, um sich vorübergehend an suboptimale Bedingungen anzupassen und ist reversibel. In Tumorzellen findet dagegen häufig eine dauerhafte und irreversible Veränderung des EGFR-Status statt. Dabei kann es zu einer von mehreren möglichen Mutationen innerhalb der konservierten Motive der Tyrosinkinase-Domäne kommen. Solche Mutationen des EGF-Rezeptors werden in Darmkrebs-Patienten allerdings nur sehr selten gefunden⁴⁵. Ein anderer Mechanismus besteht in der sogenannten EGFR-Amplifikation, bei der es zu einer Überexpression durch den Einbau mehrerer Genkopien in das Genom der Zelle kommt. Dieser Mechanismus im Kontext des kolorektalen Karzinoms ist Gegenstand verschiedener Studien⁴⁶.

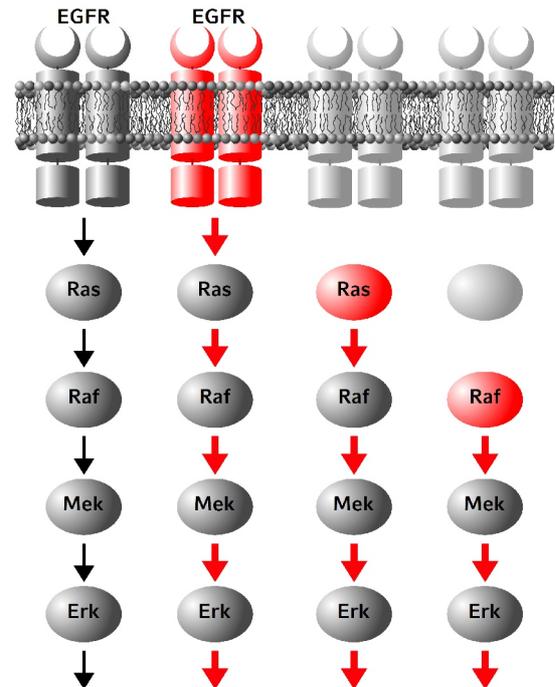


Abbildung 8: Mutationsziele in der Mitogen-aktivierten Signalkaskade. Durch Mutationen auf Ebene von EGFR, Ras oder Raf (rote Symbole) wird die Signalkaskade hyperaktiviert (rote Pfeile). Mutationen in Mek 1/2 und Erk 1/2 spielen dagegen keine Rolle für die kolorektale Karzinogenese.

In etwa 40 % aller kolorektalen Tumoren liegen Mutationen in Exon 12 oder Exon 13 des *KRAS*-Gens vor, während die weiteren Gene der *RAS*-Familie hier eine untergeordnete Rolle spielen. Durch die Mutation der katalytischen Domäne von K-Ras kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase und zum Kurzschluss des Signalwegs. Die Zelle kann sich über diesen Mechanismus in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren selbständig mit mitogenen Signalen versorgen.

Auch auf der nächsten Stufe der Effektorenkette kann es durch Mutationen zur konstitutiven Aktivierung des Signalwegs kommen. Während A-Raf und C-Raf kaum davon betroffen sind, weisen 10 % bis 18 % aller kolorektalen Karzinome eine Mutation des *BRAF*-Gens auf. Mutationen auf der Ebene von Mek 1/2 oder Erk 1/2 sind selten und scheinen kein großes onkogenes Potential zu haben (Abbildung 8)^{47 48}.

1.6.3 Wechselwirkungen zwischen Signalwegen

Die Beschreibung der Signalwege in Form linearer Kaskaden vereinfacht die tatsächliche Komplexität des verzweigten Netzwerkes der zellulären Signaltransduktion.

Einerseits sind für einige Stufen der Kaskaden Kofaktoren nötig, die an anderer Stelle eine weitere Rolle spielen können. Andererseits erkennen viele der beteiligten Moleküle mehr als ein Substrat. Hierbei kann es sich um eine Redundanz handeln, bei der alternative Isoformen oder verwandte Proteine ein Signalmolekül in seiner Funktion ersetzen. Von einigen Effektoren ist allerdings bekannt, dass sie durch verschiedene Substrate auch mehrere Funktionen, bis hin zur Schnittstelle zu anderen Signalwegen, in der Zelle einnehmen können (Abbildung 9). Solche Zusatzfunktionen sind oft schwer nachzuweisen, weil sie vom bekannten Haupteffekt überdeckt oder im experimentellen *Readout* erst gar nicht erfasst werden. Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von Erk 1/2, die je nach paralleler Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges zur Proliferation oder Differenzierung der Zellen führen kann⁴⁹.

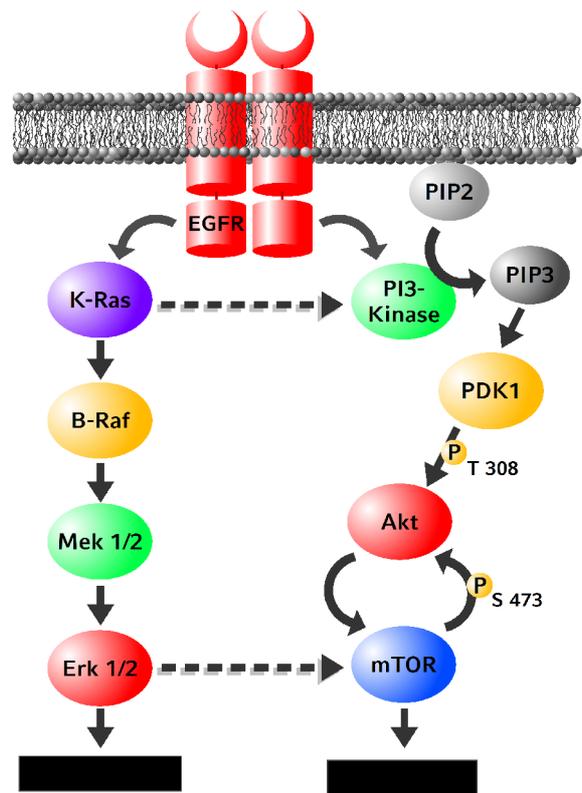


Abbildung 9: *Crosstalk* zwischen der Ras/Raf/Mek/Erk-Kaskade und der PI3/Akt-Kaskade. Zwischen den Kaskaden des MAPK-Signalweges kann es zum *Crosstalk* kommen. K-Ras kann neben Raf auch PI3-Kinasen koaktivieren und Erk 1/2 übt einen indirekten Einfluss auf die Aktivität des mTOR-Komplexes aus.

1.7 BRAF als Onkogen

1.7.1 Proto-Onkogene

Die zellulären *Pathways* zur Signaltransduktion werden oft durch einzelne Onkoproteine hyperaktiviert. Der Begriff Onkogen entstammt in historischer Hinsicht der infektiologisch-onkologischen Forschung und beschreibt dort Gene aus Tumor-induzierenden Viren. Im Genom höherer Organismen finden sich häufig Sequenzen mit hoher Homologie zu diesen Onkogenen. Diese Gemeinsamkeit zwischen viralen und eukaryontischen Genen lässt sich evolutionsbiologisch erklären, indem mRNA-Transkripte des Wirtes in infizierten Zellen revers transkribiert und in das Genom des Virus aufgenommen wurden. Bei der Übertragung zwischen den Spezies sind dabei regulatorische Sequenzen wie z.B. Bindedomänen für übergeordnete Effektorinasen verloren gegangen⁵⁰.

Proteine, die den Viren nach dem Verlust ihrer Regulierbarkeit zur Tumorinduktion dienen, haben auch im Wirtsorganismus ein onkogenes Potential. Die entscheidenden Voraussetzungen für dessen Entfaltung sind

die Entwicklung einer supraphysiologischen Enzymaktivität oder ein Verlust der Regulierbarkeit durch Mutationen, sowie die Überexpression durch epigenetische oder chromosomale Mechanismen. Diese molekularen Ereignisse, durch die es zur Aktivierung eines Onkogens kommt, können von Tumorzellen auch zur Überwindung Tumor supprimierender Proteine eingesetzt werden.

1.7.2 Das Onkogen *BRAF*

Um die Auswirkungen der V600E-Mutation in B-Raf und der im Ergebnisteil vorgestellten Isoformen auf die Funktion der Kinase zu veranschaulichen, soll ein kurzer Überblick über den strukturellen Aufbau des Proteins gegeben werden.

Die Kinase B-Raf wurde als klassisches Proto-Onkogen eines murinen Sarkomvirus von Ulf Rapp entdeckt und charakterisiert^{51 52 53}. Onkogene Mutationen sind u.a. mit Melanomen, Schilddrüsen- und Darmkrebs assoziiert. Dabei kommt B-Raf eine besondere Bedeutung in der Klassifikation des kolorektalen Karzinoms zu (siehe Kapitel 1.5.2).

Das *BRAF*-Gen enthält 18 Exons, die zu einer knapp 3 000 Basenpaaren langen mRNA transkribiert werden (Abbildung 10). Das Genprodukt weist eine Länge von 766 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa auf. In der Primärstruktur finden sich drei Domänen, die sowohl zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, als

auch bekannte funktionale Motive aufweisen. Die N-terminale Sequenz CR1 (*conserved region 1*) beinhaltet eine Domäne zur Ras-Bindung und eine Cystein-reiche

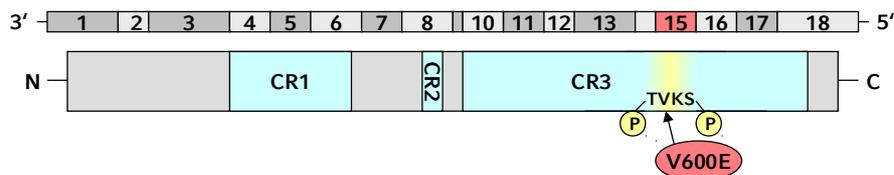


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Strukturen von mRNA und Aminosäuresequenz für B-Raf. Das *BRAF*-Gen besteht aus 18 Exons (oben). Im Genprodukt (unten) finden sich konservierte Regionen (CR1-3), die wichtige Struktur motive enthalten. Die V600E-Mutation des TVKS-Motivs liegt nahe dem C-Terminus in CR3.

Domäne zwischen Histidin²³⁵ und Cystein²⁸⁰ zur Komplexierung zweier Zink-Ionen. Die zentral lokalisierte CR2 ist eine kurze Erkennungs-Sequenz für die Proteinkinase Akt und kann von dieser an Serin³⁶⁵ phosphoryliert werden. Die konservierte Region CR3 liegt C-terminal, umfasst etwa die Hälfte des Proteins und beinhaltet die wichtigsten funktionalen Elemente zur Entfaltung der Kinase-Aktivität.

Den Anfang von CR3 bildet die negativ-regulatorische N-Region. Dieses Motiv besteht in A-Raf und C-Raf in Form einer SSYY-Sequenz, in der die erste und vierte Aminosäure phosphoryliert werden, um die Kinase zu aktivieren^{54 55}. In B-Raf lautet die Sequenz SSDD, wobei das vordere Serin⁴⁴⁶ konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Durch die stark polaren Aspartat-Reste wird die Polarität eines phosphorylierten Tyrosins ersetzt. In B-Raf fehlt somit eine wichtige Regulationsmöglichkeit, wodurch andere Sequenzmotive zu Sollbruchstellen im Sinne onkogener Mutationen werden^{56 57}. Hierin wird eine zentrale Ursache für das Phänomen vermutet, dass mutiertes B-Raf wesentlich häufiger mit Krebs assoziiert ist, als die anderen Raf-Kinasen.

Im weiteren Verlauf der CR3 liegt eine ATP-bindende Domäne mit dem typischen GxGxxG-Strukturmotiv, auch *G-Loop* genannt, zur Komplexierung des Triphosphat-Restes. Ebenfalls für die ATP-Bindung relevant sind die Sequenzen D⁵⁹⁴F⁵⁹⁵G⁵⁹⁶ und A⁶²¹P⁶²²E⁶²³, die zwischen den meisten Proteinkinasen konserviert sind⁵⁸. Des Weiteren finden sich in CR3 zahlreiche Phosphorylierungsstellen, die für die Transaktivierung, Dimerisierung oder Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich sind. Das wichtigste Motiv dabei ist die TVKS-Sequenz, die die Transaktivierung des Substrates Mek 1/2 katalysiert. TVKS stellt den mit Abstand gravierendsten *Hot-Spot* für Mutationen in B-Raf dar.

Insgesamt sind mindestens 47 verschiedene Mutationen in B-Raf beschrieben, von denen viele mit Krebs assoziiert werden, die meisten jedoch sehr selten auftreten. Die große Ausnahme ist dabei die V600E-Mutation im TVKS-Motiv, auf die etwa 80 % aller Mutationsereignisse in B-Raf entfallen⁵⁹. Analog zum SSYY-Motiv wird dabei ein unpolarer Aminosäure-Rest durch einen stark polaren ersetzt. Im Wildtyp-Protein werden Threonin⁵⁹⁹ und Serin⁶⁰² phosphoryliert, um die Kinase zu aktivieren⁶⁰. Nach der Substitution wird die Elektronendichte der Phosphate an Threonin und Serin durch das negativ geladene Glutamat in deren Nachbarschaft ersetzt und es kommt zur konstitutionellen Aktivierung von B-Raf.

1.7.3 Klinische Bedeutung

Über die Bedeutung von B-Raf^{V600E} als Onkogen sind bereits viele klinische Einzelheiten bekannt. An dieser Stelle erfolgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Daten.

Bereits in frühen Arbeiten von Vogelstein wird eine gegenseitige Exklusivität des mutierten B-Raf^{V600E} und Mutationen in Codon 12 oder Codon 13 von K-Ras postuliert. Dem Modell zufolge ist die Signalkaskade nach bereits einer dieser Mutationen hinreichend hyperaktiviert. Als ein Zusammenhang zwischen *KRAS*-Mutationen und der Resistenz gegen EGFR-Antikörper nachgewiesen werden konnte, wurde ein solcher Zusammenhang auch für B-Raf^{V600E} vermutet^{61 62}. Im Folgenden wurde die prädiktive Aussagekraft der *BRAF*-Mutation für die EGFR-Therapie sowohl als einzelner Marker, wie auch als Teil eines Markerpanels in multivariaten Analysen zunächst weiter erhärtet⁶³. Eine statistisch sichere Untersuchung in einem prospektiven Setup mit ausreichend großer Fallzahl stand aber lange Zeit aus und konnte erst durch die fortschreitende Auswertung der CRYSTAL-Studie erfolgen^{64 65}. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *BRAF*-Mutation nicht als prädiktiver Marker für die Therapie mit Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor geeignet ist⁶⁶.

Demgegenüber ist eine Bestimmung des *BRAF*-Status in Tumoren vor der Gabe B-Raf inhibierender Wirkstoffe wie Vemurafenib in jedem Fall indiziert⁶⁷. Besonders vor dem Hintergrund der Hyperaktivierung durch verstärkte Dimerisierung, die für Vemurafenib beschrieben wurden, ist eine Selektion der Patienten erforderlich.

Neben dieser prädiktiven Bedeutung spielt B-Raf^{V600E} eine Rolle als prognostischer Marker. Patienten mit *BRAF*-mutierten Tumoren haben eine deutliche schlechtere Prognose als Wildtyp-Patienten^{68 69 70 66}.

1.8 Individualisierte Therapie

Bei der Interpretation der Experimente zur B-Raf V600E-Mutation in dieser Arbeit lag ein Schwerpunkt auf der potentiellen Bedeutung der Daten für individualisierte Therapieansätze.

Unter einer individualisierten oder personalisierten Therapie versteht man die Einordnung eines Patienten in eine bestimmte Subpopulation. Anhand verschiedener Biomarker, die ein Ansprechen oder eine Resistenz für einzelne Behandlungsoptionen erwarten lassen, wird eine geeignete Therapiestrategie ausgewählt. Durch die zunehmende pharmakogenetische Erforschung der Korrelationen von Arzneimittelwirkungen mit einzelnen Genotypen wurden bereits früh personalisierte Therapiekonzepte für Krebspatienten entwickelt. Beispielsweise verlangsamten Keimbahnpolymorphismen (SNPs) in CYP2C8, einem Enzym aus der Cytochrom P450 Familie, die Metabolisierung des Mitose-Inhibitors Paclitaxel⁷¹. Und eine GT-AT-Mutation in einem Spleiß-Donor des Dihydropyrimidindehydrogenase-Gens bewirkt den Verlust eines Exons und führt zu erhöhter Toxizität des Zytostatikums 5-FU⁷². Durch die relative Seltenheit dieser beiden Genvarianten von 1,7 % bzw. weniger als 1 % erlangten sie jedoch keine große Bedeutung in der klinischen Anwendung. Die erste großflächige Selektion onkologischer Patienten anhand molekularer Tumormarker war die Statusbestimmung des Rezeptors HER2/NEU vor einer Trastuzumab-Behandlung bei Brustkrebs^{73 74}.

Die heute etablierten Konzepte zur individualisierten Therapie bestehen also vor allem in der Selektion von Patienten vor dem Einsatz eines bestimmten Wirkstoffes. Genetische und epigenetische Marker werden überwiegend einzeln und nur hinsichtlich einer bestimmten Therapieoption genutzt. Damit ist die personalisierte Therapie vorläufig auf ein minimales Setup beschränkt. Ziel zukünftiger Strategien ist es, der Analyse der Biomarker mehr Bedeutung beizumessen. Durch die Betrachtung multipler Faktoren sollen Unverträglichkeiten, aber vor allem auch das individuelle Ansprechverhalten vorhergesagt werden. Vorausgesetzt, es sind alle relevanten Biomarker bekannt und verfügbar, wäre es damit möglich für jeden Patienten *a priori* die optimale Therapie zu bestimmen.

1.8.1 Individualisierte Therapie im kolorektalen Karzinom

Anhand des Jass-Modells und der Einteilung in verschiedene molekulare Entitäten ist ersichtlich, dass beim kolorektalen Karzinom eine besonders heterogene Patientenpopulation vorliegt. Daher profitieren in der Regel nur relativ kleine Subpopulationen von Patienten von modernen zielgerichteten Therapien mit besonders spezifischen Wirkmechanismen. Eine weitgehende Selektion vor Therapiebeginn ist hier in hohem Maße sinnvoll.

Für das kolorektale Karzinom wurde die personalisierte Therapie im Jahr 2008 durch eine Empfehlung der American Society of Clinical Oncology (ASCO) eingeführt⁷⁵. Seitdem werden Patienten, die für eine Behandlung mit Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor (Cetuximab, Panitumumab) in Frage kommen, auf Mutationen im KRAS-Gen untersucht. K-Ras ist eine Kinase im MAP-Kinase (MAPK) Signalweg, der dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet ist. Hier liegt folglich eine negative Selektion vor, bei der hinsichtlich einer Therapiestrategie ein einzelner Biomarker analysiert wird.

Um eine weiter gehende und möglichst mehrdimensionale Selektion zu ermöglichen, ist ein tiefes Verständnis der zu Grunde liegenden Signalwege essentiell. Während der Wnt/ β -Catenin Signalweg als klassischer Signalweg der kolorektalen Karzinogenese gilt, rückten das MAPK- und das PI3K/Akt-*Signaling* erst in den letzten Jahren in den Fokus der Darmkrebsforschung. Trotz der vergleichsweise guten Kenntnis mechanistischer Details konnten bislang keine therapeutischen *Targets* im Wnt-*Signaling* etabliert werden. Daher sind die Zielstrukturen moderner hochspezifischer Behandlungsoptionen, die seit einiger Zeit neben den konventionellen Chemotherapeutika zur Verfügung stehen, ausnahmslos anderen Signalwegen zugehörig.

1.8.2 Herausforderungen in der personalisierten Therapie

Vor dem Hintergrund verzweigter Signalwege, deren Verbindungen untereinander nur zu einem Teil bekannt sind, werden die Herausforderungen einer zielgerichteten Tumorthherapie deutlich. So sind Patienten mit B-Raf ^{V600E}-Mutation auch unter Einsatz moderner Wirkstoffe häufig besonders schwer zu therapieren. Nach wie vor ist die Rolle des mutierten B-Rafs bei der Resistenzvermittlung gegen EGFR-Antikörper nicht vollständig geklärt. Offenbar lässt sich hier im Gegensatz zu K-Ras keine simple Ursache-Wirkungs-Beziehung in Form eines prognostischen Markers aufstellen.

Bereits frühzeitig nach Entdeckung des Zusammenhangs zwischen mutiertem *BRAF* und Krebserkrankungen wurde die Entwicklung von Inhibitoren angestoßen. Inzwischen hat mit Vemurafenib der erste hochspezifische B-Raf-Inhibitor einer neuen Generation die Zulassung erhalten, während sich weitere in den *Pipelines* der pharmazeutischen Industrie befinden. Durch den im Vergleich mit vorherigen Strategien relativ weit *downstream* in der Signalkaskade stattfindenden Eingriff erhoffte man sich eine zuverlässige Wirkung in Patienten mit Mutationen des EGFR-Signalweges.

Doch auch bei dieser Wirkstoffklasse wird in vielen Fällen eine Resistenz gegen die eingesetzten Inhibitoren beobachtet. Dass dabei vor allem der PI3K/Akt-Signalweg eine Rolle spielen könnte, wurde unter anderem durch Studien mit RAF265 nahegelegt⁷⁶. Es stellte sich heraus, dass einerseits das EGFR-*Signaling* unterdrückt, andererseits aber über eine Stimulation des PI3K/Akt-Weges kompensatorische Effekte verursacht werden können. Insgesamt scheinen die bekannten Deregulationen auf Höhe von PTEN und PI3K einen verbreiteten Resistenzmechanismus gegen die Inhibition des B-Raf Signals darzustellen.

1.9 Neue B-Raf Isoformen

Im Rahmen dieser Arbeit werden neue Protein-Isoformen für B-Raf beschrieben und charakterisiert. Dazu erfolgt hier ein Überblick über die dem Spleißen zu Grunde liegenden Mechanismen, sowie eine Zusammenfassung der bisher bekannten B-Raf Isoformen.

1.9.1 Grundlagen des Spleißens

Durch alternatives Spleißen können aus einem Gen unterschiedliche Transkripte entstehen, die sich durch die enthaltenen Exons unterscheiden. Die Transkripte kodieren in vielen Fällen für verschiedene Isoformen des gleichen Proteins, die sich z.B. in ihrer Stabilität, ihrer Reaktionsgeschwindigkeit oder der Affinität zu einzelnen Interaktionspartnern unterscheiden.

Beim Spleißen werden durch das Spleißosom oder durch Autokatalyse Intronsequenzen aus der Vorläufer-RNA geschnitten. Der klassische Intron-Typ beginnt mit einem GT-Basenpaar, dem Spleiß-Donor, und endet mit AG als Spleiß-

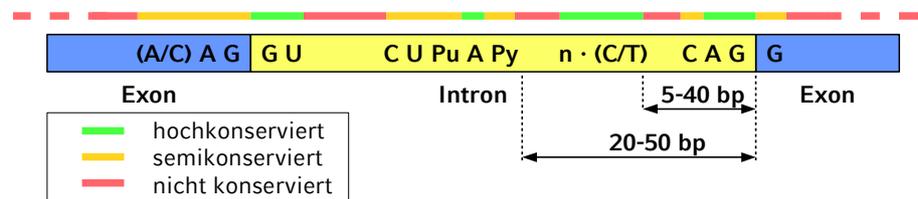


Abbildung 11: Konservierte Sequenzmotive für Spleißosom-abhängiges Spleißen. Beim Spleißen der RNA-Transkripte spielen verschiedene Konsensus-Sequenzen eine Rolle. Einige Motive sind in etwa 50 % bis 75 % (orange), hochkonservierte Motive in 75 % bis 100 % (grün) aller Introns zu finden (oben). Bei einem klassischen Intron (gelb) finden sich Spleiß-Donor (GU) und -Akzeptor (AG) an Anfang und Ende der Sequenz. Dazwischen liegen ein *Branch-Point*-Adenosin und der Polypyrimidin-Trakt.

Akzeptor. Zur Bindung an das Spleißosom ist zudem eine C/T-reiche Sequenz aus 15-20 Basenpaaren verantwortlich. Dieser sogenannte Polypyrimidintrakt liegt meist zwischen 5 und 40 Nukleotide vor dem 3'-Ende des Introns. Ein Adenosin dient als sogenannter *Branch-Point* und liegt in der Regel 20-50 Basenpaare vor dem Spleiß-Akzeptor (Abbildung 11).

1.9.2 Alternatives Spleißen des *BRAF*-Gens

Alternatives Spleißen kommt häufig bei Genen vor, deren normales Transkript bereits über mehrere Exons verfügt und ohnehin während der RNA-Prozessierung gespleißt werden. Auch für das *BRAF*-Gen mit seinen 18 Exons sind mRNA-Transkripte beschrieben worden, die von der Konsensus-Sequenz abweichen. Insbesondere in der Maus sind einige alternative Varianten bekannt, die Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben^{77 78 79}. Die bekannten Spleißvarianten des humanen Proteins führen überwiegend zu Nonsense-mRNA. Diese Transkripte werden entweder nicht translatiert, oder die kodierten Polypeptide werden aufgrund unphysiologischer Proteinfaltung mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zelle degradiert.

Vor Kurzem wurden jedoch humane B-Raf Proteinisoformen beschrieben, die Auswirkungen auf die Kinaseaktivität oder auf die Interaktion mit Inhibitor-Molekülen haben. Eine C'-terminal verkürzte Variante, in deren mRNA die Exons 14 und 15 fehlen wurde auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen⁸⁰. Untypisch für Proteinvarianten, die durch alternatives Spleißen entstehen, wurde dabei eine ausschließliche Entstehung dieser Variante aus dem Wildtyp-Allel postuliert, die mechanistisch nicht weiter beschrieben wurde. Aufgrund des Fehlens konservierter Motive wurde ein Verlust der Kinase-Aktivität für diese Isoform vorhergesagt, aber experimentell nicht weiter untersucht.

In Vemurafenib-resistenten Melanomen und Melanom-Zelllinien mit erworbener Resistenz wurde eine N'-terminal verkürzte B-Raf Variante entdeckt⁸¹. Auch für dieses sogenannte p61-BRAF(V600E) wurde ein

einzelnes Allel als Ursprung beschrieben. Im Gegensatz zur C'-terminal verkürzten Proteinvariante konnte der Zusammenhang zwischen Allel und Transkript in diesem Fall experimentell belegt werden.

1.10 Experimentelle Untersuchung von Onkogenen

Zur Untersuchung der V600E-Mutation in B-Raf auf zellulärer Ebene steht in der Laborpraxis eine Vielzahl experimenteller Optionen zur Verfügung. Die wichtigsten Methoden sollen hier mitsamt ihrer charakteristischen Vorteile und Einschränkungen kurz vorgestellt werden.

1.10.1 *in vitro*-Methoden

Transiente Transfektionen

Zur basalen Charakterisierung einzelner Onkogene kann auf simple und schnelle Methoden zu deren Überexpression zurückgegriffen werden. Dazu werden im einfachsten Fall Expressionsplasmide hergestellt und transient in Zellen eingebracht, die im Normalzustand einen Wildtyp-Hintergrund oder keine nachweisbare Expression des Onkogens aufweisen. Dabei werden häufig heterotope Zelltypen verwendet und supraphysiologische Proteinkonzentrationen erzeugt. In jedem Fall ist die Menge der DNA, die in die Zelle gelangt, nicht kontrollierbar. Zudem kann das Ergebnis verfälscht werden, da die Zellen durch den Transfektionsvorgang gestresst werden.

Stabile Transfektionen

Ein höheres Maß an experimenteller Kontrolle bietet die Selektion stabil transfizierter Klone und der Einsatz induzierbarer oder konditionaler Modelle. Doch im ersten Fall können weder der Genlokus, in den die Plasmid-DNA integriert wird, noch die Anzahl eingebauter Kopien kontrolliert werden und zu Verfälschungen des Ergebnisses führen. In konditionalen Modellen ist zudem eine Stimulation zur Genexpression nötig, durch die artifizielle Effekte hervorgerufen werden können.

Virale Methoden

In genetischer Hinsicht kontrollierter, aber auch mit mehr experimentellem Aufwand verbunden, sind virale Methoden zur Übertragung von Genen. Dabei wird eine Expressionskassette mit der kodierenden Sequenz (CDS) des Gens in das virale Erbgut eingebracht und nach der Infektion ins Genom der Wirtszelle kopiert. Da jede Zelle nur einmalig infiziert wird, kann hier mit einer kontrollierten Anzahl von Kopien gearbeitet werden. Dafür ist die Länge der nutzbaren DNA-Sequenzen begrenzt, sodass häufig auf kurze virale Promotoren zur Expression des Transgens zurückgegriffen werden muss, die supraphysiologische Expressionslevel bewirken.

RNA-Interferenz

Eine Alternative zur Beobachtung eines Onkogens in einem Wildtyp-Hintergrund ist die Verhinderung seiner Expression in der Krebszelle. Für diesen Zweck sind Methoden zur RNA-Interferenz in vielen Laboren verbreitet. Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus zur post-transkriptionellen Genregulation in eukaryontischen Organismen⁸². Die Spezifität für definierte Zielsequenzen wird dabei durch RNA-Oligonukleotide erreicht, deren Sequenz ein revers komplementäres Homolog in der jeweiligen mRNA-Zielsequenz besitzt. In einem ersten Schritt wird doppel- oder einzelsträngige RNA ins Zytosol exportiert und dort von der Ribonuklease Dicer geschnitten. Dabei wird einzelsträngige RNA zuvor durch die RNase Drosha zu kurzen Fragmenten mit Haarnadel-Konformation (*short hairpin RNA*) prozessiert. Im zweiten Schritt binden die Oligonukleotide an einen als RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) bezeichneten Proteinkomplex. Die Aktivierung dieses Komplexes erfolgt, indem der Doppelstrang dehybridisiert und RISC daraufhin die mRNA-Zielsequenz erkennt und bindet. Anschließend kann das Transkript gespalten und degradiert werden, um die Translation endgültig zu verhindern (Abbildung 12).

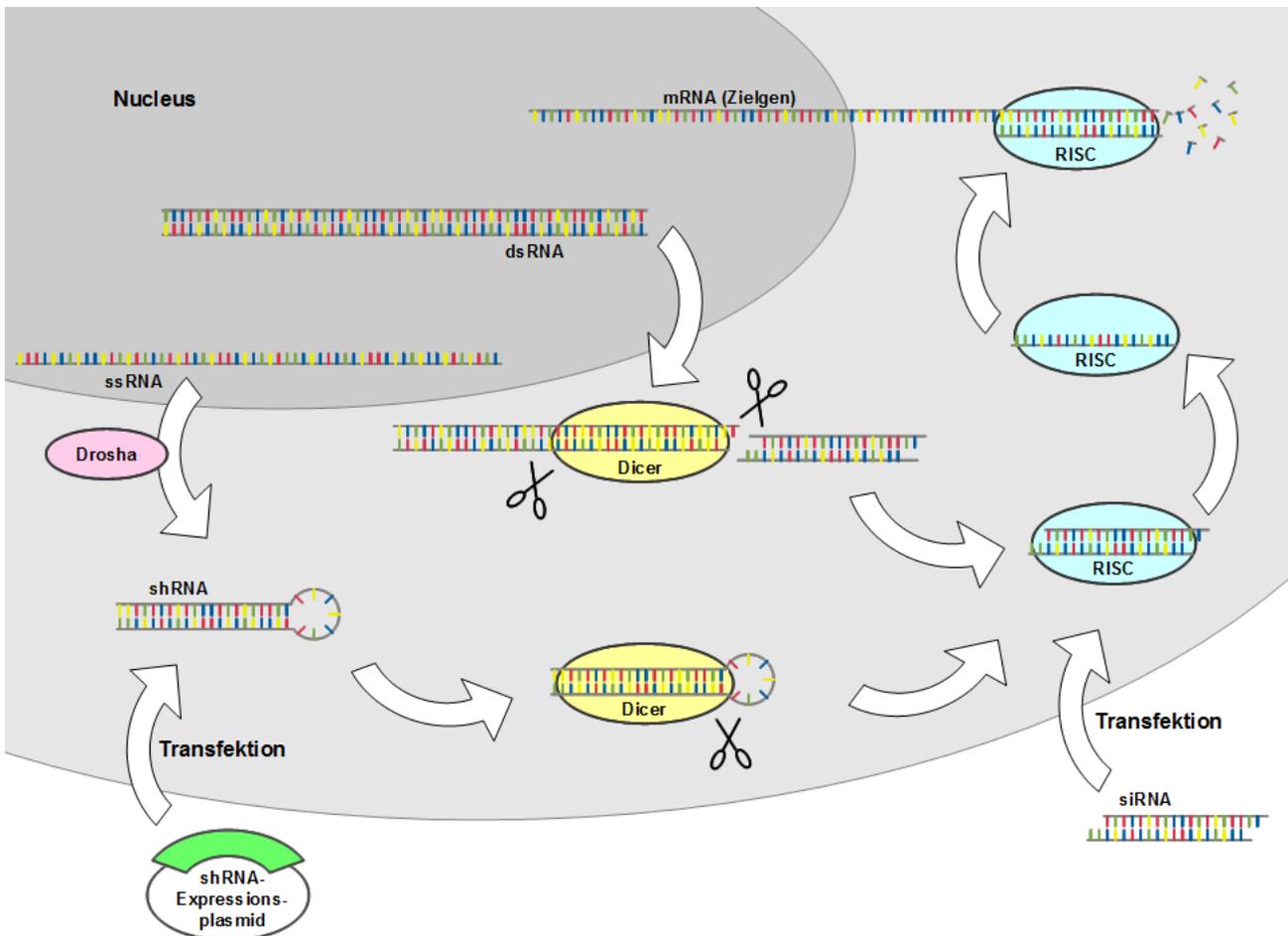


Abbildung 12: Natürliche und experimentelle Mechanismen der RNA-Interferenz. RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus zur Degradation gezielter Transkripte. Das Protein Dicer erzeugt kurze RNA-Doppelstränge, mit deren Hilfe der RISC-Komplex die Sequenz des Zielgens erkennt und abbaut. In *in vitro*-Experimenten wird die RNAi-Maschinerie in Verbindung mit Expressionsplasmiden für shRNA oder nach Transfektion mit siRNA genutzt.

siRNA

Bei der RNA-Interferenz durch siRNA werden RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bis 25 Basen durch Transfektion in die Zelle eingebracht. Die doppelsträngigen Fragmente können aufgrund Ihrer bereits optimalen Länge direkt an RISC binden und sorgen für eine unmittelbare Herabregulation der endogenen Zielsequenz. Auf diesem Wege sind ausschließlich transiente Transfektionen möglich. Der *Silencing*-Effekt wird nach wenigen Tagen durch Degradation und durch Verdünnungseffekte bei der Zellteilung neutralisiert.

shRNA

Die shRNA-Moleküle entsprechen mit ihrer Haarnadelstruktur weitgehend dem natürlichen Vorbild. Über eukaryontische Expressionsplasmide werden die *Targeting*-Sequenzen in die Zielzelle eingebracht. Je nach verwendetem Vektor-System lassen sich induzierbare und konditionale Modelle verwirklichen. Im Gegensatz zur siRNA ist dabei auch eine stabile Transfektion möglich. Auf der anderen Seite ist die Transkription der shRNA je nach Zelltyp und verwendetem Promotor variabel und dadurch weniger vorhersagbar.

Isogene Methoden

Ein Maximum an Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse bietet die genetische Manipulation der endogenen DNA. Für *in vitro*-Versuche setzt das *Somatic Cell Gene Targeting* dabei den Goldstandard, der nur von wenigen Laboren beherrscht wird. Diese Methode ist zeitintensiv und beinhaltet zudem technisch sehr anspruchsvolle Protokolle. Im Gegenzug sind in der Regel keine experimentellen Artefakte oder klonalen Effekte zu erwarten. Zudem kann diese Methode sowohl zur Deletion genetischer Elemente, als auch zur gezielten Manipulation einzelner Basenpaare eingesetzt werden⁸³.

1.10.2 *in vivo*-Modelle

In Tiermodellen können die Auswirkungen von Onkogenen auf einen komplexen Mechanismus untersucht werden. Außerdem ist es hier möglich, ganze Tumoren zu gewinnen und histologisch auszuwerten. Als Modellorganismus weisen Mäuse eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen auf und können aufgrund eines relativ geringen Bedarfs an Ressourcen in vielen Laboren gehalten werden.

In Knockout-Mäusen sind ein oder mehrere Gene durch homologe Rekombinationen deletiert. Analog dazu spricht man von Knockin-Modellen, wenn neue Gene in das murine Genom integriert oder Mutationen induziert werden. Diese Manipulationen werden in der Regel an embryonalen Stammzellen durchgeführt und dann in die Keimbahn der Embryonen eingebracht⁸⁴.

Gewebespezifische Mausmodelle

Systemische Knockouts essentieller Gene oder ubiquitäre Knockins aggressiver Onkogene können zu komplexen Phänotypen führen. Häufig wird in solchen Fällen die Auswertung der experimentellen Daten dadurch erschwert, dass es in verschiedenen Organen zu Sekundäreffekten kommen kann. In systemischen Modellen können die Ursachen beobachteter Phänotypen einzelner Organe nicht immer dem *in situ*-Vorliegen der genetischen Manipulation sicher zugeordnet werden. Endokrine Veränderungen und neuronale Schäden oder Defekte der Organe können sich im Tiermodell direkt und indirekt gegenseitig beeinflussen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll die Genmanipulation auf einen bestimmten Gewebetyp oder auf einzelne Organe zu beschränken, soweit dies im Rahmen der jeweiligen Fragestellung möglich ist. Für Untersuchungen im Darmgewebe wurde für diesen Zweck der Villin-Promotor als zuverlässiges Werkzeug etabliert.

Villin ist ein an Aktin bindendes Strukturprotein, das bei der Ausbildung der Mikrovilli im Darmepithel eine entscheidende Rolle spielt⁸⁵. Bereits bei der embryonalen Entwicklung des intestinalen Endoderms wird Villin als eines der ersten strukturell relevanten Gene transkriptionell aktiviert. Bis zum adulten Organismus behält Villin ein hohes Expressionslevel in allen Zelltypen des intestinalen Epithels bei - sowohl auf vertikaler Achse von den Krypten bis zur Spitze der Villi, als auch horizontal vom Duodenum bis zum Kolon.

Bringt man in das Genom von Versuchstieren ein Transgen ein, das unter der Kontrolle des Villin-Promotors steht, können Expressionsmuster und -level des Villins für das neue Gen genutzt werden. Madison *et al.* haben verschiedene Fragmente des Villin-Promotors in Reporterassays auf spezifisch intestinale Aktivität untersucht⁸⁶. Für die eigentliche Promotorfunktion, d.h. die Initiierung der Transkription, wird ein Fragment von etwa 6 000 bp oberhalb des Transkriptionsstarts verwendet. Aus der Tatsache, dass das erste Exon nicht translatiert wird, leiteten die Autoren ab, dass im ersten Intron weitere regulatorische Elemente vorliegen könnten. Tatsächlich konnte durch die spezifisch in kolorektalen Zellen erhöhte Reporteraktivität eine *Enhancer*-Funktion der ersten Intronsequenz nachgewiesen werden.

In der Folge wurde in zahlreichen Tiermodellen eine darmspezifische Expression der untersuchten Transgene erreicht^{87 88 89}. Dazu wurde jeweils die kodierende Sequenz (CDS) des eingebrachten Gens zusammen mit einem Polyadenylierungsteil hinter den erweiterten Villin-Promotor kloniert. Nach Integration des Konstruktes in das Genom der Versuchstiere wurde das entsprechende Genprodukt in der Regel ohne Hintergrund-Expression erfolgreich im Darmgewebe nachgewiesen.

Konditionale Mausmodelle

Permanente Knockouts und Knockins führen häufig zu einer Beeinflussung der Embryonalentwicklung bis hin zum frühen Exitus der Versuchstiere. Der Villin-Promotor spielt neben seiner gewebespezifischen Funktion in adulten Organismen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese. Veränderungen, die durch die Expression eines Transgens im Embryonalstadium hervorgerufen werden, können phänotypische Konsequenzen im adulten Tier nach sich ziehen. Besonders bei Fragestellungen zur Tumorgenese kann

daher ein konditionaler Ansatz sinnvoll sein, bei dem die Expression eines Transgens zu einem definierten Zeitpunkt initiiert wird.

Dies kann durch den Einsatz des Cre/lox-Rekombinationssystems erreicht werden^{90 91}. Das Cre-Protein ist eine sequenzspezifische DNA-Rekombinase, die die 34 bp lange loxP-Sequenz erkennt. Folgen zwei solche Sequenzen gleicher Orientierung aufeinander, schneidet das Enzym eine davon mitsamt der dazwischenliegenden DNA aus (Abbildung 13)⁹². Transgenes Erbgut wird gefloxt, indem es zur konditionalen Aktivierung oder Deaktivierung mit zwei flankierenden loxP-Sequenzen kombiniert wird. Nach Einkreuzung eines Cre-exprimierenden Tierstammes wird durch die Rekombination entweder ein integraler Teil des Gens entfernt (Deaktivierung), oder ein Transgen unter die Kontrolle eines Promotors gestellt (Aktivierung).

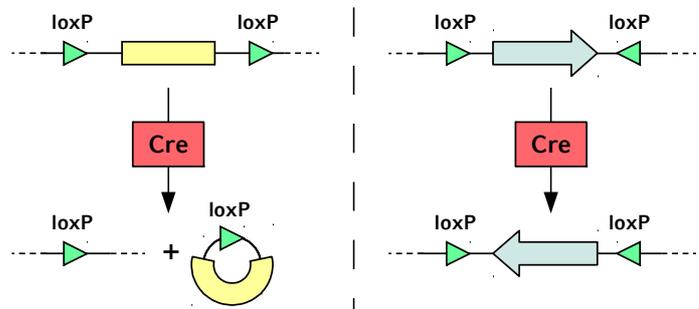


Abbildung 13: Funktionsprinzip der Cre-Rekombinase. Die Cre-Rekombinase katalysiert je nach Orientierung der loxP-Sequenzen zueinander entweder die vielfach experimentell eingesetzte Exzision (links) oder die Inversion (rechts) von DNA-Fragmenten.

Um eine Rekombination vor Versuchsbeginn zu verhindern, wird die konditionale Rekombinase Cre-ER^{T2} eingesetzt. Dabei wird das Cre-Protein mit einer modifizierten Liganden-Bindedomäne des humanen Östrogen-Rezeptors fusioniert. Durch Gabe des Liganden 4-OH-Tamoxifen wird eine nukleäre Translokation der Rekombinase und somit die genetische Rekombination zum gewünschten Zeitpunkt induziert⁹³.

Auch konditionale Modelle können auf einzelne Organe begrenzt werden. In diesem Fall wird die Gewebespezifität in der Regel über den Promotor der Cre-Rekombinase erreicht. Zur Rekombination im Darmgewebe wird auch hier der Villin-Promotor verwendet, sodass im übrigen Körpergewebe keine genetischen Veränderungen auftreten.

Durch die Gewebe-spezifische Expression der konditionalen Rekombinase kann der Promotor des zu exprimierenden Transgens frei gewählt werden. Daher können sowohl endogene Promotoren mit physiologischer Aktivität, als auch virale Promotoren mit sehr hoher Aktivität eingesetzt werden.

1.11 E-Cadherin und Darmkrebs

Ein Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Strukturproteins E-Cadherin und des zugehörigen Gens *CDH1* im Darmgewebe.

Molekulare Ereignisse wie die Hyperaktivierung zellulärer Signalwege durch genetische Mutationen werden in allen gängigen Modellvorstellungen als entscheidende Faktoren für die Auslösung oder Progression kolorektaler Tumoren angesehen. Daneben sind verschiedene chronische Faktoren bekannt,

die die Karzinogenese im Voraus begünstigen können. Hierbei stellen Vorerkrankungen mit inflammatorischen Prozessen im Darm einen der wichtigsten Risikofaktoren dar. Beim Schutz vor diesen entzündlichen Darmerkrankungen spielt das epitheliale Gewebe im Darm eine entscheidende Rolle.

1.11.1 Aufbau des Darmepithels

Das Darmepithel ist sowohl chemischen und mechanischen, als auch biologischen Einflüssen ausgesetzt und nimmt eine wichtige Barrierefunktion für den Organismus ein. Diese intestinale Barriere besteht neben immunologischen Mechanismen aus den Epithelzellen selbst und antibakteriellen Sekreten, die in die Schleimhaut abgegeben werden⁹⁴. Die Deckschicht des Darmgewebes wird dabei aus einem *Monolayer* verschiedener Zelltypen gebildet und unterliegt einer beständigen Selbsterneuerung, die von multipotenten Zellen in der Kryptenbasis ausgeht^{95 96}. Die wesentlichen vier Zelltypen im Epithel des Dünndarms sind enteroendokrine Zellen, adsorptive Enterozyten zur Nährstoffaufnahme, Schleim produzierende Becherzellen für die Bildung der Mucosa und schließlich Paneth-Zellen, die antibakterielle Peptide sekretieren.

1.11.2 E-Cadherin als Strukturprotein im Darmepithel

Zellkontakte sind ein wichtiger Faktor für die Integrität des Epithels. Sie werden im intestinalen Gewebe durch *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und Desmosomen vermittelt⁹⁷. *Adherens Junctions* bestehen hauptsächlich aus dem Strukturprotein E-Cadherin, das interzelluläre Bindungen ausbildet und diese mit dem Zytoskelett verbindet⁹⁸. Der Verlust der E-Cadherin Expression hat demnach einen entscheidenden Einfluss auf die intestinale Barriere und ist mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Darmes, allen voran Morbus Crohn, assoziiert^{99 100}.

2 Fragestellungen

2.1 B-Raf – genetisches Modell

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines genetischen *in vitro*-Modells zur Untersuchung der Bedeutung von B-Raf^{V600E} für kolorektale Tumorzellen. Bei der Auswahl eines geeigneten Modellsystems stand die bestmögliche Übertragbarkeit der *in vitro*-Daten auf *in vivo*-Modelle und vor allem auf die klinische Situation im Vordergrund. Aus diesem Grund sollten weder artifizielle Methoden zur Überexpression von Onkogenen, noch nicht-quantitative Ansätze wie RNA-Interferenz als primäres Modell eingesetzt werden. Stattdessen wurde durch die technisch anspruchsvolle Methode des *Somatic Cell Gene Targeting* ein Knockout-Setup ausgewählt, das es erlaubt, einzelne Allele quantitativ zu manipulieren, ohne weitere physiologische Prozesse zu beeinflussen.

In diesem Modellsystem sollten insbesondere phänotypische Auswirkungen der B-Raf^{V600E}-Mutation beschrieben und deren Konsequenzen auf mögliche Therapien untersucht werden. Dazu sollten in *BRAF*-mutierten Zellklonen und korrespondierenden Wildtyp-Zellen verschiedene Schlüsselkompetenzen von Tumorzellen experimentell verglichen werden, darunter die Entwicklung zellulärer Senseenz, die Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren, Apoptoseresistenz und die Wachstumskontrolle durch Kontaktinhibition. Der Einfluss B-Raf^{V600E}-abhängiger Phänotypen auf therapeutische Strategien sollte im Rahmen einer pharmakogenetischen Charakterisierung durch Chemosensitivitätsassays analysiert werden.

2.2 B-Raf Isoformen

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit neue Proteinisoformen gefunden wurden, sollte das alternative Spleißen von *BRAF*-Transkripten untersucht werden. Über eine Quantifizierung auf mRNA-Ebene sollte die Bedeutung dieses Mechanismus hinsichtlich einer möglichen Rolle für zelluläre Prozesse beurteilt werden.

2.3 E-Cadherin in der Kanzerogenese

Das Epithelgewebe im Darm nimmt eine entscheidende Barrierefunktion für den Körper ein. Strukturproteine leisten einen besonders großen Beitrag zu dieser intestinalen Barriere. Als einer dieser Schlüsselfaktoren und als Vermittler von Zellkontakten sollte die Rolle von E-Cadherin im Darmgewebe untersucht werden.

In akuten und chronischen Modellen sollte geklärt werden, wie sich der Verlust von E-Cadherin auf bakterielle Invasionen und Entzündungsprozesse im Darm auswirkt. In histologischen Analysen sollte die Morphologie des Darmepithels beurteilt und auf Entzündungsherde hin untersucht werden. Zudem sollte auch die Bedeutung von Verteilung und Reifung derjenigen Zelltypen, die bakterizide Peptide sekretieren, für die chemische Komponente der intestinalen Barriere beurteilt werden.

3 Methoden

Angaben zu den verwendeten Arbeitsmaterialien und Softwareprodukten, sowie eine tabellarische Auflistung der eingesetzten Pufferlösungen finden sich in Kapitel 9.

3.1 Standardbedingungen für Enzyme, Bakterien und Zellkultur

Enzymatische Reaktionen liefen nach den Herstellerangaben in der Regel bei 37°C oder Raumtemperatur ab. Restriktionsendonukleasen wurden mit 0,1 mg bis 10 mg DNA in den mitgelieferten Pufferlösungen inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug im Minimum eine Stunde, maximal wurde über Nacht verdaut. Die Enzymmenge wurde an DNA-Konzentration, Häufigkeit der Restriktionsstellen, Inkubationsdauer und Aktivität im jeweiligen Puffer angepasst. Soweit möglich und experimentell sinnvoll, wurden die Restriktionsendonukleasen nach Reaktionsende durch Erhitzen auf 65°C oder 80°C für 15 min inaktiviert. Bei der Arbeit mit Ligasen, Phosphatasen und anderen Nukleinsäure-modifizierenden Enzymen, die nach der Reaktion eine hohe DNA-Bindungsaffinität aufweisen, die Hitzeinaktivierung obligatorisch durchgeführt.

Die Reaktionsbedingungen für PCR wurden im Wesentlichen durch die eingesetzte Polymerase vorgegeben. Hierbei wurden die mitgelieferten Reaktionspuffer zum Einstellen von Salzkonzentration und pH-Wert eingesetzt. Gegebenenfalls wurde Magnesiumchlorid zu einer Endkonzentration von 1,25 mM bis 1,75 mM zugesetzt. Die Konzentration der Oligonukleotid-Primer betrug 0,5 µM je Primer und die der Nukleotid-Monomere 0,8 mM (0,2 mM pro Nukleotid). Die Hybridisierungstemperatur wurde etwa 1°C unter dem jeweils niedrigeren der für die Oligonukleotide berechneten Werte gewählt. Reagenzien wie Betain, DMSO oder Quinochinon, die die Hybridisierungstemperatur beeinflussen wurden nicht eingesetzt. Die Elongationstemperatur betrug bei den eingesetzten Polymerasen 72°C und für die Elongationszeit wurden je nach Herstellerangaben 1 000 min⁻¹ (Nukleotide pro Minute) oder 500 min⁻¹ zu Grunde gelegt.

Bakterien wurden in LB-Medium suspendiert oder zur Vereinzelnung von Klonen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Suspensionen wurden bei 37°C und 250 U·min⁻¹ für 16 bis 20 Stunden oder bis zum Erreichen einer definierten Optischen Dichte geschüttelt. LB-Agarplatten wurden mit dem Agarkuchen zuoberst entweder über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank oder über drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

	Durchmesser (cm)	Fläche (cm ²)	Typische Zellausbeute	Typisches Arbeitsvolumen
	15	176	2,0 · 10 ⁷	15-25 mL
	10	78	9,0 · 10 ⁶	10 mL
	6	25	3,2 · 10 ⁶	3-4 mL
 6	3,5	9,6	1,2 · 10 ⁶	3 mL
 12	2,2	4,0	4,0 · 10 ⁵	1-2 mL
 24	1,6	2,0	2,0 · 10 ⁵	300-800 µL
 48	1,1	1,0	1,0 · 10 ⁵	200-400 µL
 96	0,64	0,33	3,3 · 10 ⁴	100-200 µL

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturgefäße und ausgewählte Kennzahlen. Zellkulturgefäße unterscheiden sich in ihrem Verhältnis von Zellzahl zu Arbeitsvolumen. Assays und Konzentrationen können nicht immer ohne Weiteres auf andere Formate übertragen werden.

Ernte oder Analyse der Zellen der Serumanteil im Kulturmedium

für 48 Stunden auf 0,5 % reduziert. Alle verwendeten Zelllinien und sämtliche Klone wurden mit DMEM-Vollmedium in Einweggefäßen aus Polystyrol kultiviert (Tabelle 2). Die Zellen wurden in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Um in dem Carbonat-gepufferten Zellkulturmedium einen optimalen pH-Bereich zu erhalten, wurden 5 % CO₂ eingeleitet. Gegebenenfalls wurde vor der

3.2 Western-Blot

Zellen wurden mitsamt dem Kulturmedium aus Zellkulturschalen oder -platten durch Abkratzen auf Eis geerntet und für 3 min bei 500 RZB und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden zweimal in je 1 mL kaltem PBS resuspendiert und erneut pelletiert. Die gewaschenen Zellen wurden je nach Größe des Pellets in 50 µL bis 200 µL kaltem Phosphoprotein-Lysispuffer aufgenommen und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (1 min, 20 000 RZB, 4°C) erfolgte aus dem Überstand die photometrische Quantifizierung der Konzentration an Gesamtprotein in den Lysaten nach der Bradford-Methode.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Proben mit einem äquivalenten Volumen 2x-Lämmli-Puffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und erneut zentrifugiert (1 min, 12 000 RZB, Raumtemperatur). Für die SDS-PAGE wurden Sammelgele mit pH = 6,8 und 5 % Acrylamid, sowie Trenngele mit pH = 8,8 und 10 % oder 12,5 % Acrylamid eingesetzt. Der Transfer erfolgte nach der *Wet-Blotting*-Methode auf PVDF-Membranen. Die beladenen Membranen wurden mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T geblockt. Primärantikörper gegen Phosphoproteine wurden mit 5 % BSA in TBS-T, alle weiteren Antikörper mit einer Lösung aus 2 % Magermilchpulver in TBS-T vorbereitet. Alle Antikörper-Inkubationen erfolgten für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Immundetektion wurden je nach erwarteter Signalintensität die Substrate SuperSignal West Pico, SuperSignal West Dura und SuperSignal Elisa Femto von Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA) eingesetzt. Die Detektion erfolgte auf CL-X Posure Film (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA) mit einer Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa Healthcare GmbH, Köln).

Auf jeder einzelnen Membran wurden mehrfach Immundetektionen durchgeführt. Dabei wurde pro Membran für ein einzelnes Zielprotein höchstens ein phosphorylierungsspezifischer Antikörper eingesetzt. Zur Detektion weiterer Phosphorylierungsstufen wurden ggf. identisch beladene Gele und parallel hergestellte Membranen verwendet. Die Reihenfolge der Inkubationen wurde aufsteigend nach erwarteter Signalintensität ausgerichtet. Dabei wurden Phosphorylierungs-spezifische Antikörper möglichst in Rahmen der ersten Immundetektion eingesetzt. Die Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit vergleichbaren Mengen an Gesamtprotein wurde auf jeder Membran im letzten Detektionsdurchgang durchgeführt. Sie erfolgte mit einem Antikörper gegen das zelluläre Strukturprotein Aktin, das in eukaryontischen Zellen in besonders großer Menge vorkommt.

Jeder Western-Blot wurde in mindestens einem Wiederholungsexperiment qualitativ bestätigt.

3.3 Plasmid-Isolierung

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA wurden Kits von Macherey-Nagel, Düren (NucleoSpin Extract II, NucleoSpin Plasmid QuickPure und NucleoBond PC 500) und SLG Süd-Laborbedarf, Gauting (HiYield Plasmid Mini-Kit) eingesetzt.

Für die Plasmid-Isolierung ohne Kit wurde eine alkalische Lyse der Bakterien vorgenommen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit einer konzentrierten Salzlösung versetzt und durch Zugabe von Ethanol präzipitiert. Je nach vorgesehener Verwendung wurde gegebenenfalls eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur weiteren Reinigung durchgeführt.

3.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-Lösungen können durch Verschütteln mit organischen Lösungsmitteln von Verunreinigungen mit Proteinen befreit werden. Durch den Kontakt mit der relativ unpolaren organischen Phase werden hydrophobe Seitenketten der gelösten Polypeptide nach außen gekehrt. In dieser denaturierten Konformation werden die Proteine in der organischen Phase gelöst, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist hinsichtlich der Reinheit und Qualität anderen Methoden zur Reinigung von Nukleinsäuren überlegen (Tabelle 3).

	Produkt A	Produkt B	Produkt C	Manuelle Präparation	Manuell mit Extraktion
spektrometrische Reinheit	1,60	1,80	1,65	1,80	1,80
Reichweite Sequenzierung	810	900	800	640	940
1. Fehler Sequenzierung	650	650	550	--	850

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Methoden zur Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA. Getestet wurden Produkte von Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasmid), SLG (HiYield Plasmid Mini-Kit) und Fermentas (GeneJet Plasmid Miniprep Kit) im Vergleich mit der Präparation ohne Kit. Letztere wurde ohne weitere Reinigung und nach Phenol-Chloroform-Extraktion berücksichtigt. Es sind Mittelwerte aus jeweils zwei Präparationen und Sequenzierungen aufgelistet.

3.5 Kompetente Bakterien *E.coli* DH5 α

Als Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika mit *Escherichia coli* K12 DH5 α angeimpft und über Nacht im Inkubator geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 250 mL LB-Medium ohne Antibiotika mit 1 mL der Vorkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der relativen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm regelmäßig kontrolliert. Bei einer Optischen Dichte von $OD_{600} = 0,4$ wurde die Bakterien-Suspension im Eiswasserbad auf 0°C gekühlt und mit 3 000 RZB für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden mit einer vorgekühlten Pipette in eisgekühltem Puffer TBF I resuspendiert und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 2 000 RZB für 5 min bei 4°C erneut pelletiert und in kaltem Puffer TBF II resuspendiert. Die Suspension wurde auf Trockeneis aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6 Transformationen

Bis zu 5 µL Plasmid-DNA Lösung oder Ligase-Reaktionsmix wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorgelegt und auf Eis gekühlt. Zu jeder Plasmid-DNA wurden 50 µL Bakterien-Suspension pipettiert und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 20 sek. Anschließend wurde für 2 min weiter auf Eis inkubiert, bevor 500 µL vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben wurden.

Zur Rekonstitution der Zellmembranen und zur Entfaltung von Resistenzen wurden die Bakterien im SOC-Medium bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 30 min für Ampicillin-Resistenzen und 60 min bei Verwendung anderer Antibiotika.

Bei Transformationen mit etablierten Plasmiden wurde die präparative Kultur direkt mit der SOC-Kultur angeimpft. Bei Ligationsansätzen oder wenn Einzelklone benötigt wurden, wurde die Suspension bei 4 000 RZB für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µL abgenommen. Mit dem verbliebenen Medium wurden die Bakterien resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

3.7 Transfektionen

3.7.1 Präzipitationsmethode

Neben Elektroporationen stellen Präzipitationsmethoden einen bewährten und zuverlässigen Ansatz zur Transfektion eukaryontischer Zellen dar. Bei der ursprünglichen Calciumphosphat-Kopräzipitation werden das Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA in naszierende Calciumphosphat-Kristalle integriert. Diese Methode ist heute in vielen Laboren durch den Einsatz von Polyethylenimin (PEI) abgelöst worden. PEI ist in verschiedenen Polymerlängen und -verzweigungsgraden erhältlich, die sich von der Calciumphosphat-Methode durch höhere Transfektionseffizienz und geringere Zytotoxizität unterscheiden¹⁰¹.

Zur Transfektion wurden subkonfluente Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale vorgelegt. Bei transienten Transfektionen wurde die Zelldichte je nach Versuchsdauer und erwartetem Proliferationsverhalten angepasst. Für stabile Transfektionen wurden die Zellen maximal bis zu einer Konfluenz von 60 % inkubiert.

Zwei Stunden vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 mL DMEM ohne Zusätze weiter inkubiert. Insgesamt 3 µg reiner Plasmid-DNA (oder äquimolarer Mischungen bei Kotransfektionen) wurden in 0,2 mL OPTI-MEM vorgelegt. Dazu wurden 15 µL einer Lösung von 1 g · L⁻¹ PEI (25 000 kDa, linear) pipettiert, sofort kräftig miteinander verschüttelt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Endozytose wurde das DNA-PEI-Präzipitat tropfenweise zu den 2 mL DMEM auf den Zellrasen gegeben und bei gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach zwei Stunden wurden 10 mL DMEM-Vollmedium zugegeben.

Bei transienten Transfektionen wurde die Inkubation für ein bis drei Tage fortgesetzt, bevor die Zellen geerntet und lysiert wurden. Um stabile Transfektionen zu erreichen, wurde über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Dem Folgemedium wurde ein Antibiotikum zugegeben, um auf resistente Zellen zu selektieren. Dafür wurde zuvor in sogenannten *Kill Curves* die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der 100 % der basalen Zellen innerhalb von sieben Tagen sterben. Zur Selektion wurden die transfizierten Zellen mit etwa dem Doppelten dieser Konzentration inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden das Absterben der nicht resistenten Zellen und die Koloniebildung der stabilen Transfektanden kontrolliert. Ausreichend große Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgelöst, in eine 24-well Zellkulturplatte überführt und in 10 µL Trypsin-Lösung vereinzelt. Für polyklonale Populationen wurde die komplette 10 cm Zellkulturschale in Trypsin-Lösung aufgenommen und frisch ausgesät. Die Expansion erfolgte anschließend weiterhin im Selektionsmedium.

3.7.2 Lipidvesikel-basierte Methode

Kurze Nukleinsäuresequenzen lassen sich nur schlecht mit PEI oder anderen präzipitierenden Reagenzien in Zellen einbringen. Daher wurde bei allen Transfektionen mit siRNA Lipofectamine 2000 gemäß den Anwendungshinweisen des Herstellers verwendet. Dabei wurde je 1 µL des Transfektionsreagenzes pro 125 pg Oligonukleotid eingesetzt.

3.8 Reverse Transkription

RNA wurde als Gesamt-RNA mit Trizol (Life Technologies GmbH, Darmstadt) oder Trifast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) isoliert und gereinigt. Es wurden jeweils bis zu 4,0 µg RNA mit dem Invitrogen SuperScript II First Strand Synthesis System unter Verwendung von Zufallshexamer-Primer in cDNA umgeschrieben.

3.9 Quantitative PCR

In der quantitativen PCR wurde die Menge cDNA als Template eingesetzt, die 0,20 µg bis 0,25 µg Gesamt-RNA entsprach. Bei Zielsequenzen, die nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten waren, wurden im Einzelfall auch Äquivalentmengen von 1,0 µg RNA verwendet.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte während der Zyklen wurde der Reaktionslösung SYBR-Green I aus einer 10 000-fach konzentrierten Stammlösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt oder Lonza Cologne GmbH, Köln) zugesetzt.

Als Geräteplattform und für die Aufbereitung der Daten wurden das Eppendorf Mastercycler ep realplex und das Rotor-Gene 3000 von Corbett Life Science samt der jeweils zugehörigen Software eingesetzt.

3.10 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden beim Labor für Funktionale Genanalysen LAFUGA des Genzentrums der LMU München und bei Eurofins MWG Operon in 85560 Ebersberg in Auftrag gegeben. Die Sequenz-Histogramme wurden in der Software Chromas Lite ausgewertet und gegebenenfalls in textbasierte Sequenzdaten (FASTA) konvertiert. Sequenzvergleiche wurden mit dem Onlineservice BLAST des NCBI oder mit der Software Serial Cloner durchgeführt.

3.11 Genotypisierungen

Zur Detektion der T1799A-Mutation in *BRAF* wurde die betroffene Genregion per PCR mit Finnzymes Phusion DNA-Polymerase amplifiziert. Mit einem Primerpaar aus gBRAF-300FW und gBRAF-300RV wurde ein etwa 300 Basenpaar langes Fragment erstellt und mit gBRAF-seq-FW sequenziert. Im Histogramm wurde der Genotyp anhand der Signalstärken für die betreffenden Basen ermittelt.

Die Genotypisierung von Mäusen im Villin-*BRAF*-Modell wurde mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Jede Probe wurde mit zwei Primerpaaren analysiert, bei denen der vorwärtige Primer innerhalb des murinen Villin-Promotors lag (mVillin-8479-FW und mVillin-8651-FW). Um die Schnittstelle zwischen Promotor und Transgen abzudecken, wurde in allen Fällen BRAF-CDS-143-RV als rückwärtiger Primer verwendet, der innerhalb der *BRAF*-Sequenz lokalisiert ist.

3.12 Somatic Cell Gene Targeting

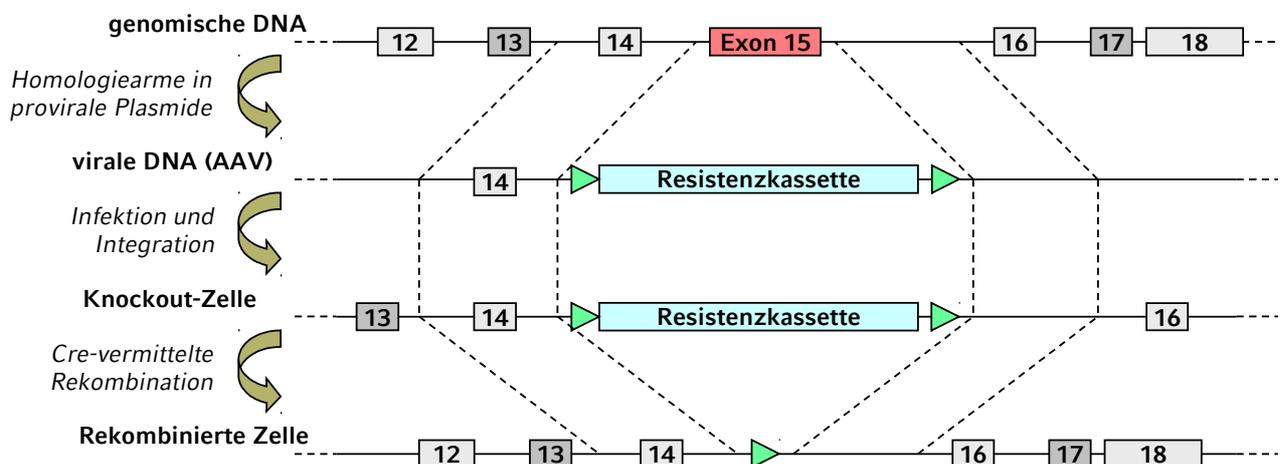


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Somatic Cell Gene Targetings. Es wurden homologe Sequenzen vor und hinter Exon 15 aus dem Erbgut der Zielzellen in ein provirales Targeting-Konstrukt eingefügt. Nach Synthese Adeno-assoziiierter Viren und der Infektion von RKO-Zellen rekombiniert die AAV-Sequenz bevorzugt mit einem der *BRAF*-Allele.

Mit dieser Methode kann ein Gen in kultivierten Zellen auf einem einzelnen Allel manipuliert werden⁸³. Dazu wird ein Exon mittels Adeno-assoziiierter Viren (Stratagene AAV Helper-Free System) gezielt rekombiniert und ausgetauscht. Anstelle des Exons wird eine Resistenzkassette, bestehend aus einem eukaryontischen Promotor, einem Resistenzgen und einer Polyadenylierungssignal-Sequenz, ins Genom eingebracht (Abbildung 14). Die Resistenzkassette wird von loxP-Sequenzen flankiert. Im Fall einer

Mutagenese (Knockin) befindet sich hinter der zweiten loxP-Sequenz eine entsprechend manipulierte Kopie des betreffenden Exons. Für eine Deletion (Knockout) ist die Resistenzkassette allein ausreichend. Die verbleibenden Sequenzen des Zielgens auf dem rekombinierten Allel sind nach der Rekombination unvollständig. Zudem kommt es durch eine Verschiebung des Leserasters zu einem frühzeitigen Translationsabbruch.

Ursprünglich in 2004 publiziert, entwickelt sich das *Somatic Cell Gene Targeting* zu einer nützlichen Methode in der therapeutischen Forschung und der Grundlagenforschung. Neben den USA wurde sie bereits in China, Italien, Israel, Dänemark und Japan angewendet^{102 103 104 105 106}.

3.12.1 Klonierung des *Targeting*-Konstruktes

Für ein *Targeting* des *BRAF*-Gens wurde Exon 15 als ein geeignetes Rekombinationsziel identifiziert. Es überschreitet die maximale Länge von 400 Basenpaaren nicht, besteht aus einer nicht durch drei teilbaren Anzahl von Basen und bildet den Anfang der Transaktivierungsdomäne. Durch die Entfernung von Exon 15 und den dadurch induzierten Kettenabbruch wird vom rekombinierten Allel ein verkürztes Protein mit unvollständiger Kinasedomäne synthetisiert. Zudem fällt mit Exon 15 die T1799A-Mutation aus der genetischen Sequenz heraus, wodurch das Auftreten mutierter Proteinvarianten ausgeschlossen ist.

Um eine zielgerichtete Rekombination zu erreichen, wurden Abschnitte *upstream* und *downstream* von Exon 15 gesucht, die sich im *Targeting*-Konstrukt als homologe Sequenzen eignen. Die Homologiearme sollten dazu eine Länge von 900 bis 1 100 Basenpaaren aufweisen, einen möglichst niedrigen Anteil repetitiver Sequenzen haben und hinsichtlich potentiell enthaltener Restriktionsstellen nicht mit der weiteren Klonierungsstrategie kollidieren. Die verwendeten Homologiearme sind 1 085 und 961 Basenpaare lang und entsprechen den übrigen Anforderungen (Abbildung 15).

Ein Aliquot RKO-E1 wurde lysiert und zur Gewinnung genomischer DNA einem RNA-Verdau mit RNase H unterzogen. Die genomische DNA wurde über das NucleoSpin Cell & Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, obsolet) isoliert und als Template zur Amplifikation der Homologiearme verwendet. Dafür wurden zunächst mit den Primerpaaren LHA-FW und LHA-RV, sowie RHA-FW und RHA-RV die Reaktionsbedingungen soweit angepasst, dass in hinreichend großen Reaktionsvolumina nach 20 PCR-Zyklen ausreichende Produktmengen für die weitere Klonierung synthetisiert werden konnten. Vor der endgültigen Herstellung der Homologiearme wurden die Primer um zusätzliche Sequenzen ergänzt, um eine Verwendung mit dem Adeno-assoziierten Virus zu ermöglichen. Die Primer LHA-RV und RHA-FW wurden um die Sequenzen Linker A bzw. Linker B aus dem Stratagene AAV Helper-Free System erweitert. An LHA-FW und RHA-RV wurden *NotI*-Restriktionsstellen angefügt.

Zur Vorbereitung der Fusions-PCR wurden die Plasmide pNeDaKO-Hyg und pNeDaKO-Neo mit den Restriktionsendonukleasen *BspHI* bzw. *PvuI* verdaut. Durch Agarosegelelektrophorese wurden die Fragmente mit den Resistenzkassetten isoliert. In einem weiteren Agarosegel wurden Aliquots der Homologiearme und der Resistenzkassetten eingesetzt, um die Konzentration der jeweiligen Komponenten zu bestimmen. Für eine äquimolare Zusammensetzung wurden die Homologiearme entsprechend der relativen Sequenzlängen im Massenverhältnis 1:4 mit jeweils einer der Resistenzkassetten in einer Fusions-PCR eingesetzt.

```
tatgataattactacataaagttgagcagtgaaagagcactttcagttcgggttagtcatgggaaagcttcactcaggagttagaatttgtattca
gttttaaggatggatagatgaataggtggaaaatagaacgaaagctaacttggagggttgggtgtaggaggggagcattgaacacagtggtggga
ttaaatacaaggatattttaaaggacatggataaaataggcttgactggagtgaaaggtttgtattggtaactagtaaagataaagcaaagtc
tttaatagaaaacaagattttgactgtaccattatagtgatggttccctataatcttaaattcatttacagtcatttttaattctctgtgaag
ggtttattacaatgtactattttcagttgtatcatgattctaaataagcttttacacccccaagtagttctgtgagatttcgaggccagagtc
tttagccctactcaggttaaaatgatgttttggttttcagTTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAgtatcct
tctgaaatttgtctggaagtttgaaaaacatcctgactttttctctgcattttgtcttcacattatgtaaaaacagttttcatgctaagttc
gatatactgtaaagagaattaataaaggattgtgcatgcatgatataggagagcaggataccacagcctgttttgggttctcgacaactgaaca
ttacaagaaaatctacagaagcttttacaatagtaggagtttttgattgcttgcattttatcagcactataaaaactgatagttttgttag
ctatctattagtcctttcagacctctgaccttgctcagtggttagtgagatataactgaagactctaaattatataacaatgaggtgagaaaa
acataatatttctctocctaagtgacagactaagatactatctgcagcatcttcattccaatgaagagcctttactgctgcccaggagtgcca
agagaatattctggcctacattgctaaaaatctaattgggaaagtttttaggttctcctataaaacttaggaaagcatctcacctcatcctaacacat
ttcaagcccaaaaatcttaaaagcaggttatataggtctaaatagaactaatcattgttttagacatactattgactctaagaggaaagatga
agtactatgttttaagaatattatattacagaattatagaaatagatctcttacctaaactctcataatgcttgcctctgataggaatga
gatctactgttttcttacttactacacctcagATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGA
AATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTGAACAGTGTCTGGATCCATTTGTGGATGgtaagaattgaggctatttttccactgattaaatt
tttggccctgagatgctgctgagttactagaaaagtcattgaaaggtctcaactatagatattttcatagttccagatttcacaaaaatcagtggt
cttattttttatgtaaatagatttttaacttttttcttacccttaaaacgaatattttgaaaccagtttcagtgattttcaaaaataat
atgctctataaacagtggtttcatalttttattcttaataaatatgaacccttaaaacgaatattttgaaaccagtttcagtgattttcaaaa
aaatataatgctctataaacagtggtttcatalttttattctaaattgttttaaagtttttggttcaaaatgttctgtgtaccctgttgaaaaaa
aaacaggtatgcaatttaagcaggtgtgatccacagccattatgatgttttgtaagagaactactccttttaacagagaagctgtttcgca
atcttatttaagcctaaattggaaagttacttcttttagactagaaaagtatctcataaattatggggcagctggaagaggaaagacaaaaaa
tgagaggtagattaacagcctgtgctgtcttgcatagctcttctctctctgtttttgctttgtggaagaagaagaagagaaagttctaaa
agaaggaacaaaaatctgtgtgcttgcagcaagctgtggaagctcagtcataatgatcattccctaaacagcattcttaaaagggctcct
cacaccgttttagaggtccacaagatcttccctttgtgagacaagattttctttatataccttcaacccaaaacaacacattgcaacagactgag
tgcaaaagcaaatatgagaatccagctggctgctgttaagccagacattgaggagaatcacaggccactcatggtgctggagtcocatagttcc
agctacctgggaggctagggcaggaggatcaacttgatcccaggagttgactggcctgctcaacatagtgagaccccatctctaaaccataaaag
gaggataattgttagtactattcttcttaaaacttttttgataaatagttatttttcaataaaaatgaatgatctgtgttaacatctactgt
ttatttttagtagttaaatgaattactagtttaatttctccattaaattttaatggtaaacatccacagatataatctacctaacaacaaagt
ctttatcatcctcaataatttttaagagtgaaaaagagtc
```

intron
 repetitive Sequenz
 EXON
 PRIMER Sequenz
 DELETIERTE Sequenz

Abbildung 15: Schematische Darstellung der für das *Somatic Cell Gene Targeting* benötigten Sequenzen im *BRAF*-Gen. Mit Hilfe zweier Primerpaare wurden die etwa 1 000 Basenpaare langen Hologiesequenzen vor und hinter Exon 15 amplifiziert. In diesem Abschnitt des menschlichen Genoms finden sich nur wenige repetitive Sequenzmotive.

In der Fusions-PCR wurden LHA-FW-NotI und RHA-RV-NotI als terminale Primer eingesetzt. Gleichzeitig wurde durch die Hybridisierung der terminalen Linker-Sequenzen der Homologiearme mit den reverskomplementären Abschnitten der pNeDaKO-Fragmente ein Megapriming-Effekt erreicht (Abbildung 16). Unter Verwendung eines Touchdown-Temperaturprotokolls und durch die verzögerte Zugabe der terminalen Primer nach dem zweiten PCR-Zyklus konnte das Fusionsprodukt nach wenigen Zyklen in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Aufgrund vergleichbarer Fragmentlängen konnten die Fusionsprodukte nicht von der jeweils als Template verwendeten Resistenzkassette getrennt werden. Da die Resistenzkassetten wegen fehlender *NotI*-Restriktionsstellen nicht mit der weiteren Klonierung interferieren, wurden Template und Fusionsprodukt zusammen isoliert.

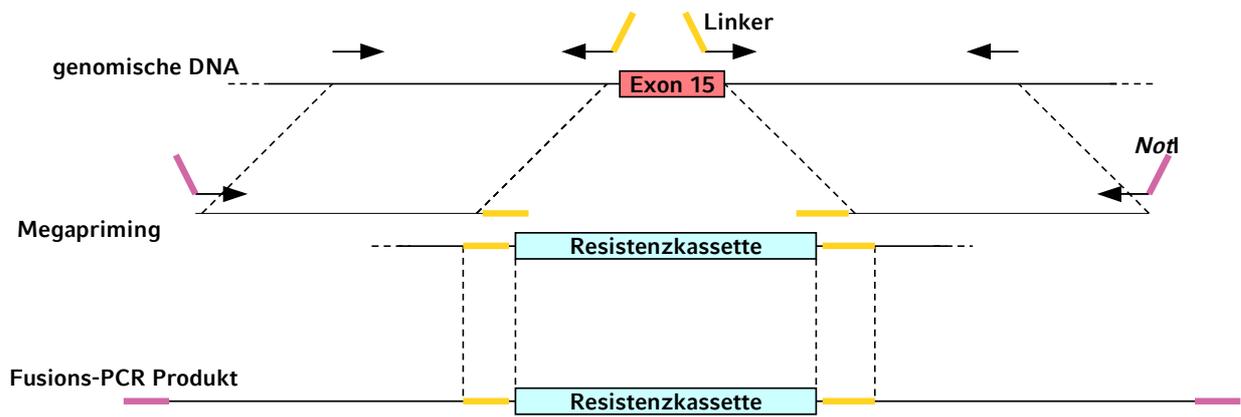


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Fusions-PCR. In einer Standard-PCR wurden zunächst die Homologiearme amplifiziert und um Linker-Sequenzen (gelb) ergänzt. In der Fusions-PCR vermittelten die Linker das Megapriming. Zudem wurden die terminalen Primer um *NotI*-Restriktionssequenzen (violett) für die weitere Klonierung erweitert.

Fusionsprodukt und pAAV-MCS wurden mit *NotI* verdaut und die Plasmid-DNA anschließend dephosphoryliert. Die Nukleinsäuren wurden im Agarosegel isoliert und quantifiziert. In einer Ligationsreaktion wurden die *Targeting*-Plasmide pAAV-BRAF-Hyg und pAAV-BRAF-Neo hergestellt und in *E.coli* vervielfältigt.

3.12.2 Herstellung der Viruspartikel

AAV-293 ist ein Derivat der Zelllinie HEK293 (*Human Embryonal Kidney*), das für die Produktion Adenoassoziierter Viren optimiert wurde. Um die erhöhte Kompetenz aufrecht zu erhalten, dürfen die Zellen bis zur Transfektion mit proviralen Plasmiden eine Konfluenz von 70 % nicht überschreiten.

In 10 cm Zellkulturschalen wurden 70 % konfluente AAV-293 mit jeweils 2,5 µg pHelper, pAAV-RC und entweder pAAV-BRAF-Hyg oder pAAV-BRAF-Neo nach der PEI-Methode transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und beides in einem 15 mL Gefäß vereint. Die Zellen wurden durch dreifaches Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen im Wasserbad bei 37°C lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation mit 15 000 RZB für 5 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.12.3 Gewinnung und Charakterisierung eines Einzelklones

Im Gewebe können sich die einzelnen Zellen gegenseitig mit ausreichenden Konzentrationen an Wachstumssignalen versorgen. Bei kultivierten Zellen ist dies in hohen Verdünnungen oder nach Vereinzelnung nicht möglich. Hier können nur solche Zellen ohne weitere Stimulanzen proliferieren, die sich selbst mit Wachstumssignalen versorgen. Wie die meisten Krebszelllinien lässt sich RKO sehr gut vereinzeln.

RKO-Zellen wurden im Hämacytometer gezählt. Es wurden ca. 30 Zellen in 20 mL DMEM-Vollmedium aufgenommen und in einer 96-well Zellkulturplatte eingesät. Nach fünf Tagen wurden Kammern mit Einzelkolonien positiv und solche mit Mehrfachklonen negativ markiert und fortan im Abstand einiger Tage

kontrolliert. Sobald die ersten Einzelklone mehrlagiges Wachstum zeigten, wurden die Zellen in entsprechend größere Kulturgefäße überführt. Während des Expansionsprozesses wurde genomische DNA aus Zellaliquots isoliert, um per Sequenzierung die *BRAF*^{T1799A}-Mutation in den Subklonen zu bestätigen. Ein weiteres Aliquot der Klone wurde zum Testen der Rekonstitution eingefroren und nach zwei Tagen wieder aufgetaut. Anschließend wurden vitale Zellen für Sensitivitätsassays auf die im Folgenden verwendeten Antibiotika ausgewählt.

In einer zwölf-tägigen Inkubation wurde die Sensitivität auf G418-Sulfat und Hygromycin B getestet. Bei Konzentrationen oberhalb von 0,8 bis 1,0 g · L⁻¹, bzw. 250 bis 300 mg · L⁻¹ wurden keine überlebenden Zellen beobachtet. Nach dieser basalen Charakterisierung wurde der Subklon RKO-E1 für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

3.12.4 Primäre Infektion und Selektion

Zellen des RKO-Subklones wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60 % inkubiert. Es wurden 0,2 mL AAV-BRAF-Hyg Lysat mit serumfreien DMEM ohne Antibiotikazusätze auf 2 mL verdünnt und direkt auf den Zellrasen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden 10 mL DMEM-Vollmedium zugegeben und für 33 Stunden weiter inkubiert. Die anschließend konfluenten Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, in zwei Flaschen DMEM-Vollmedium (entsprechend etwa 1,1 L) mit 0,8 g·L⁻¹ Hygromycin B aufgenommen und zu je 0,2 mL pro Kammer auf 96-well Zellkulturplatten verteilt. Es wurden jeweils fünf Platten gestapelt und zur weiteren Inkubation zusammen in einer Lage Polyethylenfolie eingewickelt. Infektion und Selektion wurden nach einer Woche mit zwei weiteren 10 cm Zellkulturschalen wiederholt

Im Abstand einiger Tage wurde die Koloniebildung kontrolliert. Aus 1,1 L Zellsuspension, entsprechend einer 10 cm Zellkulturschale, wurden etwa 1 200 Kolonien gewonnen. Kammern mit Einzel- und Mehrfachkolonien wurden entsprechend markiert. Nach fünf Wochen nahmen besonders schnell wachsende Kolonien mehr als die Hälfte der Kammerfläche ein und zeigten mehrlagiges Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen in markierten Kammern mit 20 µL Trypsinlösung suspendiert. Ein Aliquot von 2 µL wurde in 96-well PCR-Platten überführt, in denen zuvor jeweils 5 µL Lyse-N-Go PCR-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA) vorgelegt wurde. Die restlichen Zellen wurden mit 0,2 mL frischem Selektionsmedium weiter inkubiert.

Die Lyse der Zellaliquots erfolgte durch Anwendung des folgenden Temperaturprotokolls:

65°C	30 sek
8°C	30 sek
65°C	90 sek
97°C	180 sek
8°C	30 sek
65°C	180 sek
97°C	60 sek
65°C	60 sek
80°C	300 sek

In 96-well PCR-Platten wurden jeweils 20 μL PCR-Mastermix mit KAPA Taq-Polymerase und inklusive 5 % PCR-Färbelösung vorgelegt und mit 2 μL Lyse-N-Go Lysat versetzt. Bei den Primerpaaren BRAF-Screening-A und BRAF-Screening-B liegt jeweils ein Primer außerhalb des Homologiearmes in der genetischen Sequenz und der andere innerhalb der Resistenzkassette. Auf diese Weise konnten nach 35 PCR-Zyklen positive Klone anhand einer diskreten Produktbande im Agarosegel identifiziert werden. Kandidaten, die mit beiden Screening-Primepaaren positiv erschienen, wurden genotypisiert. Analog der RKO-Subklonierung wurden aus verifiziert positiven Klonen Zelllinien durch Expansion etabliert.

3.12.5 Sekundäre Infektion

Knockout-positive Zellen aus der ersten Infektion wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und analog zur primären Infektion mit AAV-BRAF-Neo Lysat infiziert. Die Selektion erfolgte im 96-well Format durch Zusatz von $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ G418-Sulfat und $0,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hygromycin B. Ausgehend von einer 10 cm Zellkulturschale wurden Ausbeuten von 1 100 bis 1 500 Kolonien erhalten. Infektion und Selektion wurden seriell wiederholt und mit Hilfe der Screening-PCRs analysiert. Klone, für die in beiden Screening-Setups positive Signale erhalten wurden und die resistent gegen beide Antibiotika waren, wurden durch Sequenzierung verifiziert.

3.13 Sensitivitätsassays

Vor Beginn der Versuche zur Chemosensitivität wurde die optimale Zelldichte bestimmt. Alle zu untersuchenden Zelllinien wurden in einer Reihe verschiedener Konzentrationen in 96-well Zellkulturplatten vorgelegt und in DMEM-Vollmedium inkubiert. Diejenige Anfangsdichte, die nach sieben Tagen eine Konfluenz von 100 % zeigte, wurde für die weiteren Assays verwendet.

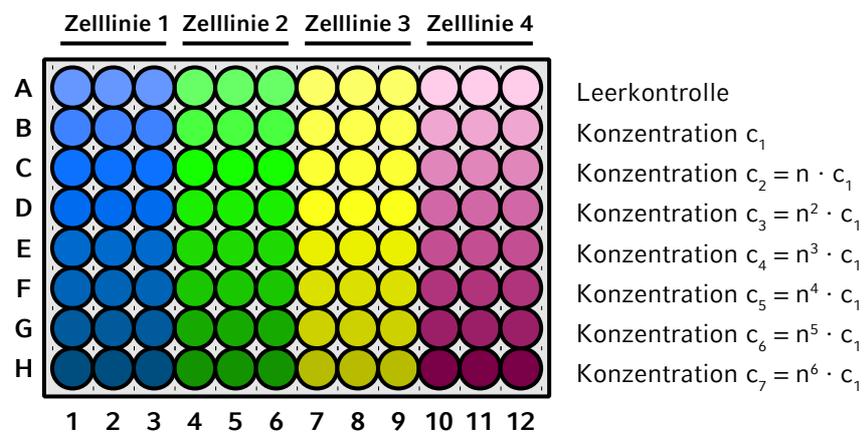


Abbildung 17: Pipettierschema für Chemosensitivitätsassays. Die Konzentrationsreihen in 96-well Platten wurden in der Regel zeilenweise um einen Experiment-spezifischen Faktor erhöht.

Die zu vergleichenden Zellen wurden in 100 μL DMEM-Vollmedium mit der ermittelten Zelldichte im 96-well Format eingesät und inkubiert. Nach einem Tag wurden 100 μL Medium mit dem zu testenden Wirkstoff zu jedem Aliquot gegeben. Neben einer Leerprobe wurden in einer Verdünnungsreihe sieben Konzentrationen eines Wirkstoffes hergestellt. Jede Konzentration wurde mit jeder Zelllinie in Triplikaten untersucht (Abbildung 17).

3.14 Proliferationsassays

Zur Bestimmung der Proliferation wurde eine definierte Anzahl von Zellen mit DMEM-Vollmedium in Multiwell-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zelldichte wurde so gewählt, dass die am schnellsten wachsenden Zellen nach sechs Tagen eine Konfluenz von 100 % gerade erreichten. Am nächsten Tag wurde in einem Teil der Aliquots die Zellzahl im Hämacytometer bestimmt. Aufgrund methodisch bedingt relativ großer Abweichungen zwischen einzelnen Messwerten wurde in allen Proliferationsassays mit 4-fach Bestimmungen gearbeitet. Bei der weiteren Kultivierung der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen von 24 Stunden die Zellzahl im Hämacytometer bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

3.15 Maximale Zelldichte

Zur Bestimmung der maximale Zelldichte wurden die Zellen mit 70 % Konfluenz in 6-well Zellkulturplatten ausgesät und inkubiert. Die Auszählung erfolgte im Abstand von 24 Stunden im Hämacytometer.

3.16 Alamarblau-Assays

Der Farbstoff Alamarblau ist membrangängig und diffundiert in kultivierte Zellen. Durch elektrochemische Reduktionsreaktionen mit Molekülen der zellulären Atmungskette kommt es zur Änderung der chromophoren Eigenschaften. Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Stoffwechselaktivität und somit zur Vitalität der Zellen. Alamarblau wird im Gegensatz zum klassischen MTT-Assay aufgrund seines relativ hohen Redoxpotentials von allen zellulären Redox-Komponenten reduziert (Tabelle 4). Alamarblau kann sowohl in photometrischen, als auch in fluorimetrischen Setups eingesetzt werden. Da der Farbstoff weder in seiner oxidierten, noch in der reduzierten Form zytotoxisch wirkt, können auch Zellen mit geringer Stoffwechselaktivität untersucht werden. Hierfür werden Messungen über mehrere Stunden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Redoxreaktion	Potential E_0 (mV) bei pH = 7,0 und 25°C
$\text{NAD}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^+$	- 320
$\text{NADP}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{NADPH} + \text{H}^+$	- 320
$\text{FAD}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{FADH} + \text{H}^+$	- 220
$\text{MTT}_{(\text{oxidiert})} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{MTT}_{(\text{reduziert})}$	- 110
$\text{Cytochrom}_{(\text{oxidiert})} + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Cytochrom}_{(\text{reduziert})}$	+ 80 bis + 290
$\text{Alamarblau}_{(\text{oxidiert})} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Alamarblau}_{(\text{reduziert})}$	+ 380
$\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 820

Tabelle 4: Normalpotentiale verschiedener Redoxreaktionen. Alamarblau wird aufgrund seines hohen Redox-Potentials von allen zellulären Redox-Komponenten der Atmungskette reduziert.

Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und inkubiert. Zur Analyse der Vitalität wurden 10 µL Alamarblau-Lösung (AbD serotec, Düsseldorf) zu 200 µL Kulturmedium gegeben und durch Schütteln

vermischt. Umgehend nach der Zugabe erfolgte die erste photometrische Messung im CytoFluor 4000-System (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt) bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm (± 25 nm) und einer Emissionswellenlänge von 620 nm (± 30 nm). Der Farbumschlag wurde anfangs in Abständen von 10 Minuten beobachtet. Je nach Einschätzung der Stoffwechselaktivität wurden die Zeitpunkte für weitere Messungen gewählt.

3.17 Durchflusszytometrie

Für zytometrische Messungen wurden die zu analysierenden Zellen im Kulturmedium mit dem Zellschaber geerntet. Nach Zentrifugation (900 RZB, 2 min, Raumtemperatur) wurde in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden etwa 100 000 Zellen in 200 μ L Nicoletti-Puffer aufgenommen. Zur Interkalation des im Puffer enthaltenen Fluorophors Propidiumiodid in die genomische DNA wurde vor der Analyse für mindestens 5 min bei 4°C inkubiert.

Die Vermessung der Zellen erfolgte an einem Accuri C6 oder mit dem FACSCalibur-System (beide: BD Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg). Jede Probe wurde bis zur Erfassung von 10 000 Ereignissen analysiert. Alle Datensätze wurden entweder mit der Accuri-Software CFlow Plus prozessiert, oder im FCS-Format gespeichert und mit Flowing Software ausgewertet. Als Messgröße für das Zellvolumen diente das Vorwärtsstreulicht der Anregungswellenlänge, das bei vergleichbaren Zelltypen Rückschlüsse auf die relativen Partikelgrößen ermöglicht. Zur Darstellung und Auswertung der Zellzyklusverteilung wurde das FL2-H Signal (FACSCalibur) oder das FL2-A Signal (Accuri C6) verwendet.

3.18 Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität

Während im schwach sauren Milieu die meisten eukaryontischen Galaktosidasen inaktiv sind, bleibt eine Seneszenz-spezifische Variante des Enzyms aktiv. Die β -Galaktosidase-Aktivität bei pH = 6 ist daher als zuverlässiger Marker der zellulären Seneszenz etabliert. Zellen mit erhöhter Aktivität dieses Enzyms können durch das synthetische Substrat X-gal dauerhaft gefärbt werden¹⁰⁷. Dabei wird das gelöste Substrat von der β -Galaktosidase gespalten und bildet nach Oxidation und Dimerisierung einen in Wasser und Alkohol schwerlöslichen Indigo-Farbstoff.

Als Negativkontrolle für die Färbung seneszenten Zellen wurden beliebige kolorektale Krebszelllinien verwendet, die zum jeweiligen Versuchszeitpunkt parallel in Kultur waren. Als Positivkontrolle wurden murine embryonale Fibroblasten gewonnen und in Primärzellkultur mindestens dreimal passagiert. Die Zellen wurden in 6-well Zellkulturschalen ausgesät und inkubiert. Vor Erreichen der Konfluenz wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit je 1 mL Paraformaldehydlösung (2 % in PBS) für maximal 5 min fixiert. Um eine Überfixierung zu vermeiden, wurde die Fixierlösung durch erneutes zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in einem verschlossenen Wasserbad mit X-gal Färbelösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde bei Raumtemperatur einmal mit PBS und zweimal mit Methanol gewaschen. Die selektive Färbung seneszenten Zellen wurde im Durchlicht-

Mikroskop anhand der Kontrollzelllinien überprüft und durch Auszählung einzelner Gesichtsfelder quantifiziert.

Zur bildlichen Dokumentation der Seneszenz-abhängigen Färbung wurde eine Gegenfärbung mit Azokarminrot vorgenommen. Es wurde eine Lösung von 0,1 % des Farbstoffs in 1 % Essigsäure direkt auf die getrockneten Zellen gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde der Farbstoff sukzessive bis zum Erreichen der gewünschten Farbtintensität mit PBS ausgewaschen. Zum Abschluss wurden die Zellen erneut zweimal mit Methanol gewaschen und getrocknet.

3.19 RNA-Interferenz

3.19.1 siRNA

Transiente Transfektionen mit siRNA-Oligonukleotiden wurden nach der Lipofectamine-Methode durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden 0,5 µg pBMN-Z-IRES-GFP zu jeweils einem Kontroll-Aliquot zugegeben. Die Expression des Kontrollgens wurde im Fluoreszenzmikroskop qualitativ kontrolliert. Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion geerntet und für Western-Blots lysiert.

3.19.2 shRNA

Das Plasmid pTER/shBRAF stellt eine Möglichkeit zur induzierbaren Transkription von shRNA-Sequenzen in transfizierten Zellen dar¹⁰⁸. Nach Kotransfektion mit einem Expressionskonstrukt für den Tet-Repressor bindet dieser im Promotorbereich der shRNA und verhindert deren Transkription. Durch die Zugabe von Tetracyclin zum Kulturmedium wird der Repressor gebunden und seine Affinität zum Tet-Operon herabgesetzt. Die zelluläre Transkriptionsmaschinerie synthetisiert nun *Short-Hairpin*-Konstrukte, in deren Gegenwart die endogene *BRAF*-mRNA degradiert wird.

RKO-E1 und RBOW wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 µg pTER/shBRAF und 1,5 µg pcDNA6/TR transfiziert und über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Selektion mit 8 mg · L⁻¹ Blasticidin und 1 g · L⁻¹ Zeocin begonnen. Nach etwa drei Wochen wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze abgelöst, in 20 µL Trypsin-Lösung vereinzelt und zunächst in 48-well Zellkulturplatten zu monoklonalen Versuchslinien expandiert.

Die Identifikation und Auswahl positiver Klone erfolgte in Western-Blots für B-Raf und phospho-Erk 1/2.

3.20 B-Raf Tiermodelle

Alle verwendeten Tiere entstammten dem C57BL/6 Hintergrund. Männliche Mäuse wurden paarweise, weibliche in Gruppen von bis zu vier Tieren in Käfigen des Typs II/long gehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Nagetierfutter (V1534, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest).

3.20.1 Konditionaler *BRAF*-Knockin im *ROSA26*-Genlocus

Aus dem Plasmid pcDNA3/*BRAF*^{T1799A} wurde die kodierende Sequenz für B-Raf^{V600E} per PCR amplifiziert und um terminale Restriktionssequenzen erweitert. Mit Hilfe der Enzyme *NheI* und *NotI* wurde das PCR-Produkt in die Expressionskassette des Plasmids pBigT eingefügt. Der Vektor pBigT ist ein verbreitetes Adapterplasmid für das *Targeting* im *ROSA26*-Genlocus¹⁰⁹. In pBigT befindet sich eine loxP-flankierte Resistenkassette bestehend aus dem PGK-Promotor, dem neo-Resistenzgen und einer dreifachen Polyadenylierungssequenz aus dem SV40-Virus. Der Resistenkassette vorangestellt ist eine Spleiß-Akzeptorsequenz. 5'-terminal vor dieser liegt eine *PacI*-Restriktionsstelle. Nach der Kassette folgen ein *Polylinker*, die Polyadenylierungssequenz des BGH-Gens (*Bovine Growth Hormone*) und eine *Ascl*-Restriktionsstelle (Abbildung 18).

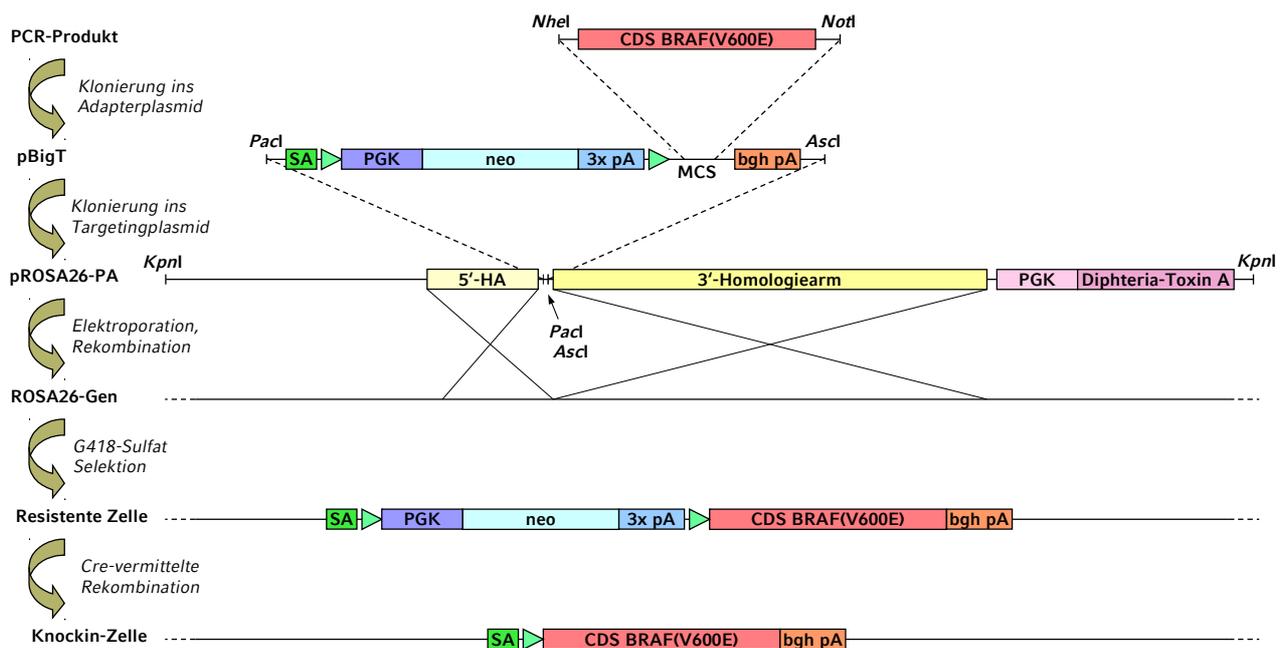


Abbildung 18: Knockin der humanen *BRAF*-Sequenz in den *ROSA26*-Genlocus der Maus. Die kodierende Sequenz für humanes B-Raf^{V600E} wurde zunächst in einem Adapter-Plasmid ohne eigenen Promoter zwischen eine Neo-Resistenkassette und eine Polyadenylierungs-Sequenz kloniert. Das Konstrukt wurde im eigentlichen *Targeting*-Plasmid um homologe Sequenzen erweitert, die eine Rekombination im *ROSA26*-Genlocus der Maus ermöglichen. Nach Cre-vermittelter Exzision der Resistenkassette wird das mutierte *BRAF* unter dem endogenen Promotor mit Hilfe eines Spleiß-Akzeptors exprimiert.

Ein Fragment, das alle beschriebenen Sequenzmerkmale enthielt, wurde mit *PacI* und *Ascl* aus pBigT ausgeschnitten und in pROSA26-PA inkloniert. Homologiearme vor und hinter den funktionalen Motiven von etwa 1 100 bzw. etwa 4 300 Basenpaaren ermöglichen eine Rekombination mit der genomischen DNA im

Zellkern. Das Plasmid pROSA26-PA ist ein Derivat des *Targeting*-Konstruktes pROSA26-1, das um Restriktionsstellen für *PacI* und *Ascl* erweitert wurde¹¹⁰. Beide Enzyme haben lange Erkennungssequenzen von acht Basenpaaren, weshalb diese relativ selten vorkommen und in der Regel nicht mit der weiteren Klonierungsstrategie kollidieren. Der *ROSA26*-Genlocus ist für Rekombinationen gut zugänglich und erzeugt nach seiner Zerstörung keinen offensichtlichen Phänotyp¹¹¹. ES-Zellen, die die Plasmid-DNA unspezifisch aufgenommen haben, exprimieren ein 3'-terminal zur Homologieregion lokalisiertes Gen für das Diphtheria-Toxin A und sterben ab. Nach erfolgreicher Rekombination werden nur die gefloخته Resistenzkassette und das Transgen in die Keimbahn der Mäuse aufgenommen. Nach dem *Targeting* mit pROSA26-Plasmiden wird der endogene *ROSA26*-Promotor genutzt, um das Transgen ubiquitär zu exprimieren.

Das *Targeting*-Plasmid wurde mit *KpnI* linearisiert und durch Elektroporation mit dem Amaxa Nucleofector System (Lonza Cologne GmbH, Köln) in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden mit $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ G418-Sulfat selektiert.

3.2.0.2 Konditionaler *BRAF*-Knockin im Aktin-Genlocus

In Mausmodellen deren Knockin-Gen unter der Kontrolle eines endogenen Promotors steht werden in der Regel Genexpressionsraten in physiologischen Größenordnungen erreicht. Berücksichtigt man die relativ kurze Lebensdauer einer Maus, sind gerade für onkologische Fragestellungen oft höhere Expressionsraten des zu untersuchenden Gens sinnvoll.

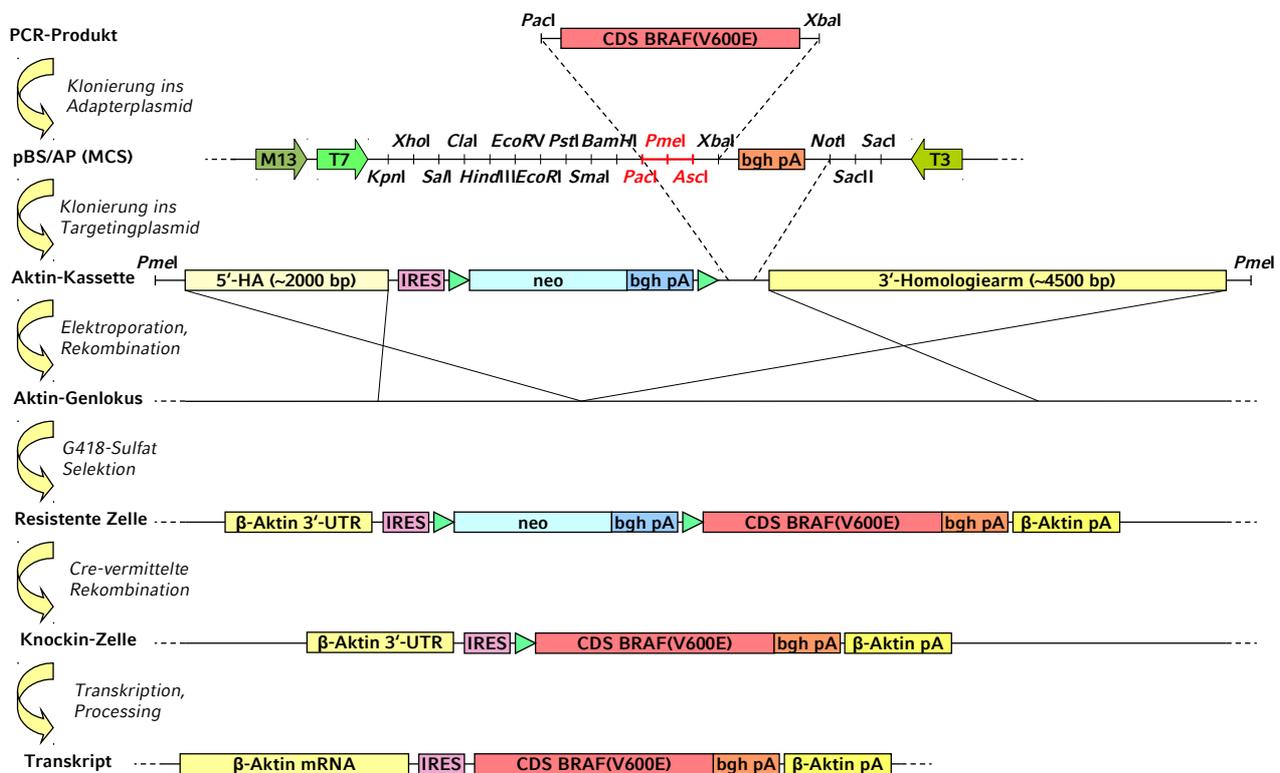


Abbildung 19: Knockin einer *BRAF*-Expressionskassette durch *Targeting* des Aktin-Lokus. In diesem Setup werden *BRAF*-Sequenz und Resistenzkassette in die 3'-terminale untranslatierte Region des Aktin-Gens eingefügt. Die Expression des Resistenzmarkers oder, nach Cre-vermittelter Rekombination, die des transgenen *BRAF* wird über eine interne Ribosom-Erkennungssequenz erreicht. Im Gegensatz zur *ROSA26*-Strategie bleibt in diesem Setup die endogene Expression des rekombinierten Genlocus erhalten (siehe Abbildung 18).

Politi *et al.* konnten zeigen, dass durch einen Knockin im Genlocus für β -Aktin eine hohe Promotoraktivität mit den Vorteilen des zielgerichteten Knockin-Ansatzes verbunden werden kann¹¹². Das Strukturprotein β -Aktin macht bis zu 5 % des zellulären Proteins aus und ist essentiell für das Überleben einer Zelle. Um diesen stark exprimierten Genlocus durch die Manipulation nicht in seiner Funktion zu beeinträchtigen, werden die für den Knockin benötigten Sequenzen in die 3'-terminale UTR (untranslatierte Region) des Gens eingefügt. Durch das Einfügen einer IRES-Sequenz (*Internal Ribosomal Entry Site*) wird das β -Aktin-Transkript zur Expression des Transgens genutzt. Die mRNA wird dabei um eine geflochte Expressionskassette für das neo-Resistenzgen, sowie um das Knockin-Gen einschließlich einer Polyadenylierungssequenz erweitert. Von dem Transkript des manipulierten Gens wird weiterhin Aktin für das Zytoskelett synthetisiert. Darüber hinaus produziert die Zelle durch die IRES zunächst den Selektionsmarker und nach Cre-vermittelter Rekombination das Knockin-Gen (Abbildung 19).

Für das *Targeting* des β -Aktin Genlocus wurde pBS/AP/pA als Adapterplasmid verwendet. Dabei handelt es sich um einen modifizierten pBluescript Klonierungsvektor, in dessen *Polylinker* die Erkennungssequenzen von *PacI*, *PmeI* und *Ascl* eingefügt wurden. Darüber hinaus befindet sich die pA-Sequenz des BGH-Gens zwischen *XbaI*- und *NotI*-Sequenz. Das Plasmid wurde in dieser Form zur Verfügung gestellt von Dr. Marlon Schneider, Genzentrum der Universität München. Ein Amplifikat der *BRAF*^{T1799A}-CDS wurde über *PacI* und *XbaI* Restriktionsstellen in pBS/AP/pA einkloniert. In einem kombinierten *PacI*-*NotI*-Verdau wurden CDS und pA-Sequenz ausgeschnitten und in das ursprünglich publizierte *Targeting*-Plasmid eingefügt. Die Transfektion von murinen embryonalen Stammzellen durch Elektroporation mit dem linearisierten Plasmid und die anschließende Selektion erfolgten analog zum Knockin-Ansatz im *ROSA26*-Genlocus.

3.20.3 Transgenes Villin-BRAF-Modell

Im Plasmid p12.4KVill befindet sich ein etwa 12 400 bp langes Fragment des murinen Villin-Gens, in dem die Promotorregion samt *cis*-aktivierender Elemente enthalten ist¹¹³. Die Sequenz beginnt etwa 6 700 bp aufwärts des ersten Exons, das eine 5'-UTR enthält. Sie endet ca. 5 700 bp nach Transkriptionsbeginn in der 5'-terminalen Region des ersten translatierten Exons. Die Villin-Sequenz enthält kein ATG-Triplet, sondern endet kurz vor dem endogenen Translationsstart. Auf die Promotor-Enhancer-Region folgt im Plasmid ein *Polylinker* für die Einklonierung der im Darm zu exprimierenden Sequenz und ein Polyadenylierungsteil aus dem SV40-Virus (Abbildung 20).

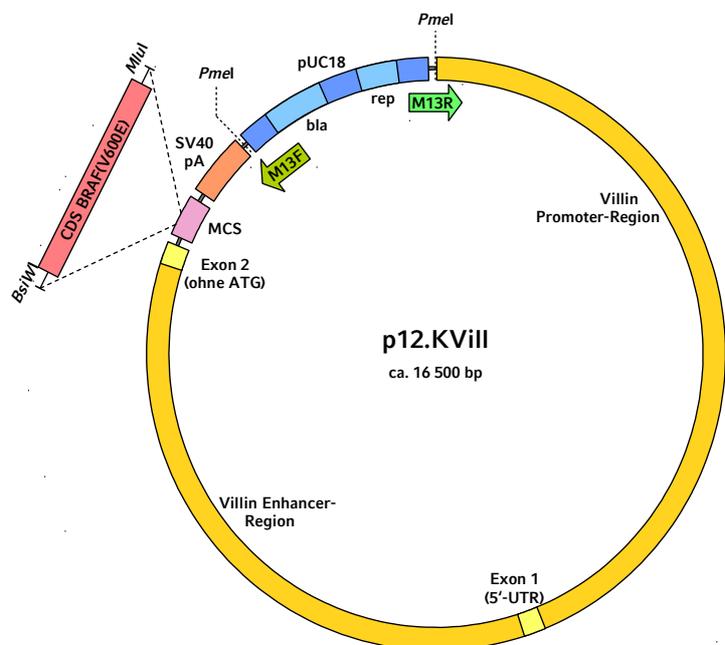


Abbildung 20: Expression von BRAF in Abhängigkeit vom murinen Villin-Promotor. Zur Expression des *BRAF*-Gens im Darmgewebe transgener Mäuse wurde ein Expressionskonstrukt mit Villin-Promotor hergestellt, mit *PmeI* linearisiert und in die Keimbahn der Mäuse eingebracht.

Ein Amplifikat der CDS für V600E-mutiertes B-Raf wurde über *Pfl23I* (Isochizomer zu *BsiWI*) und *MluI* in p12.4KVill einkloniert. Anschließend wurden die funktionalen Elemente des pUC18-Rückgrates über einen Verdau mit *PmeI* entfernt. Die linearisierte DNA wurde im Genzentrum der Universität München in die Vorkerne befruchteter muriner Eizellen injiziert. Auf diese Weise manipulierte Zygoten wurden ebenfalls von Mitarbeitern des Genzentrums in trächtige Mäuse transplantiert. Nach der Geburt der Jungtiere wurde anhand von Schwanzbiopsien auf eine erfolgreiche Integration des Transgens in das Genom der Tiere untersucht. Die dabei eingesetzten Primerpaare (BRAF-CDS-143-RV in Kombination mit mVillin-8479-FW oder mVillin-8651-FW) deckten gezielt die Schnittstelle zwischen Villin-Promotor und *BRAF*-CDS ab.

3.21 Alternatives Spleißen

Im Rahmen einer Klonierung der kodierenden *BRAF*-Sequenz wurde Gesamt-RNA aus RKO-Zellen gewonnen. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription in cDNA mit Hilfe des Invitrogen SuperScript II First Strand Synthesis System. Die *BRAF*-CDS wurde mit den Primern BRAF-42-FW-EcoRI und BRAF-2388-RV-XbaI amplifiziert und in den Klonierungsvektor pUC19 ligiert. Kompetente *E.coli* DH5 α wurden mit den Ligationsprodukten transformiert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und inkubiert. Bei der routinemäßigen Kontrolle von Einzelklonen durch Sequenzierungen mit den Klonierungs-Primern wurde ein neuartiges *BRAF*-Transkript identifiziert. Zeitgleich mit der Verifikation und Aufarbeitung der mRNA-Variante wurde das alternative Spleißprodukt von Seth *et al.* in verschiedenen Zelllinien des kolorektalen Karzinoms beschrieben⁸⁰.

Aufbauend auf diesem Zufallsfund wurde die Transkription des *BRAF*-Gens in RKO näher untersucht. Dazu wurden weitere Amplifikate der *BRAF*-cDNA in pUC19 einkloniert. Nach der Transformation kompetenter Bakterien wurde die Plasmid-DNA von 192 Einzelkolonien in Minipräparationen isoliert. Zur gezielten Analyse des alternativen Spleißens im Bereich der Transaktivierungsdomäne wurden PCR-Produkte mit einem Primerpaar aus BRAF-CDS-1727-FW und BRAF-CDS-2077-RV generiert. Im Agarosegel wurden die Laufhöhen der analytischen PCR-Amplifikate mit der Standardsequenz verglichen. Plasmid-Proben mit abweichenden Sequenzlängen wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und sequenziert.

Alle 192 Klone wurden analog dazu in einer PCR mit BRAF-CDS-1082-FW und BRAF-CDS-1191-RV auf alternatives Spleißen im Bereich von Exon 9 untersucht¹¹⁴.

Die vollständige CDS jeweils eines verifizierten Klons für jede B-Raf Variante wurde aus pUC19 mit Hilfe der Restriktionsstellen *EcoRV* und *XbaI* in das Expressionsplasmid pcDNA3 umklont. HEK293-Zellen wurden mit der Plasmid-DNA transfiziert und mit G418-Sulfat auf stabil transfizierte Klone selektiert. Einzelklone wurden von 10 cm Zellkulturschalen in Multiwell-Platten überführt und expandiert. Zur Bestimmung der B-Raf Kinaseaktivität wurden Zelllysate auf die Phosphorylierung von Mek 1/2 und Erk 1/2 im Western-Blot untersucht. Die Signalintensitäten für B-Raf, pan Mek 1/2 und phospho-Mek 1/2 wurden densitometrisch ausgewertet.

3.22 *Cdh1*-Modell

Sämtliche Zuchtmaßnahmen im *Cdh1*-Modell fanden im Tierstall des Genzentrums der Universität München statt. Diese Arbeiten wurden ausschließlich von Mitarbeitern des Genzentrums durchgeführt und werden hier in zusammengefasster Form wiedergegeben.

Mäuse mit homozygot gefloxtem E-Cadherin Allel *Cdh1^{fl/fl}* wurden mit Villin-Cre-ER^{T2} transgenen Tieren gekreuzt^{115 116}. Nach der Entnahme von Schwanzbiopsien wurden die Jungtiere per PCR genotypisiert. Anschließend wurden doppelt heterozygote Tiere mit *Cdh1^{w/fl}* Mäusen verpaart, um eine Villin-Cre-ER^{T2};*Cdh1^{fl/fl}* Linie zu erzeugen. Homozygot Cre-defiziente Tiere aus diesen Würfen wurden als Kontrollen eingesetzt.

In den so generierten Verum-Tieren steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Villin-Promotors, der in adulten Mäusen spezifisch im Darmgewebe aktiv ist. Durch intraperitoneale Gabe von jeweils 1 mg 4-OH-Tamoxifen wurde die Expression der Cre-Rekombinase nach verschiedenen zeitlichen Protokollen induziert. Bei Injektionen an den Tagen 1, 2 und 3 wurde ein besonders starker Phänotyp erreicht, bei dem die Mäuse in den darauffolgenden Tagen verstarben. Für die Versuche wurde daher ein milderes Protokoll mit Tamoxifen-Gaben an den Tagen 1, 2, 5 und 8 verwendet, bei dem die Tiere an Versuchstag 12 getötet und sezert wurden.

3.22.1 Panethsche Zellen

Der histochemische Teil der Arbeiten zur Charakterisierung der Panethschen Zellen wurde von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität München durchgeführt und wird hier in zusammengefasster Form wiedergegeben.

Die Dünndärme von Mäusen, die an Tag 1, 2, 5 und 8 mit Tamoxifen behandelt wurden, wurden entnommen, von anhaftendem Gewebe befreit und mehrmals mit PBS gespült. Ähnlich der verbreiteten Swiss-Roll Präparationsmethode, jedoch ohne die Därme längs zu öffnen, wurden die Organe aufgerollt, in 4 % Formalin fixiert und in Paraffinblöcke gegossen¹¹⁷. Querschnitte durch das Gewebe wurden nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung mikroskopisch kontrolliert. Unversehrte Bereiche mit etwa 4 mm Kantenlänge wurden aus dem Paraffinblock ausgeschnitten und in einem Epon-analogen Einbettmedium eingeschlossen. Von den so umgebetteten Darmabschnitten wurden Semidünnschnitte in 2 µm Schnittdicke angefertigt und mit Azur-Eosin-Methylenblau angefärbt (Giemsa's Färbung). Einzelne Gesichtsfelder wurden in 630-facher optischer Vergrößerung fotografiert und zur quantitativen Auswertung zusätzlich digital vergrößert.

3.22.2 Bakterielle Distribution

Die Assays zur bakteriellen Distribution in Abhängigkeit zum *Cdh1*-Status der Mäuse wurden im Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie der Universität München durchgeführt. Die Arbeiten wurden überwiegend von Mitarbeitern des Pettenkofer-Institutes durchgeführt und werden hier in zusammengefasster Form wiedergegeben.

Weibliche Tiere im Alter von sechs bis acht Wochen wurden an den Versuchstagen 1, 2 und 4 mit Tamoxifen behandelt. Anschließend wurde oral mit induzierbar biolumineszierenden *Yersinia enterocolitica* infiziert¹¹⁸. Dazu wurden den Tieren nach 16 Stunden Futterentzug jeweils 10⁹ CFU in einem Volumen von 50 µL mit einer 200 µL Pipettenspitze oropharyngeal appliziert. Nach fünf Tagen Inkubation, gefolgt von der Induktion der bakteriellen Lumineszenz durch intraperitoneale Gabe von 120 mg L-Arabinose, wurden die Mäuse seziert. Die Detektion erfolgte auf einem IVIS Lumina System (Caliper Life Sciences GmbH, Mainz). Frisch entnommene Dünndärme wurden als Ganzes luminometrisch aufgenommen. Zusätzlich wurde das intestinale Lumen gespült und in verschiedenen Verdünnungen auf Müller-Hinton Agarplatten ausgestrichen. Analog dazu wurden Peyersche Plaques isoliert, homogenisiert und ebenfalls ausgestrichen. Nach 36 Stunden Inkubation bei 27°C erfolgte die luminometrische Quantifizierung.

3.22.3 Charakterisierung eines chronischen *Cdh1*-Knockouts

An Villin-Cre-ER^{T2};*Cdh1*^{fl/fl} Tiere wurden die chronischen Auswirkungen eines Verlustes von E-Cadherin im Darm der Mäuse auf die Barrierefunktion untersucht. Dazu wurden acht Verum- und acht Kontrolltiere aus der spezifisch pathogenfreien Haltung in einen Tierstall nach Felasa-Standard überführt. Durch eine Initiationsphase von zwei Monaten, wurde die einheitliche mikrobiotische Angleichung der Versuchstiere gewährleistet. Danach wurde das *Cdh1*-Allel der Verumtiere durch intraperitoneale Gabe von 1 mg 4-Hydroxy-Tamoxifen (10 g · L⁻¹ in Maisöl) rekombiniert, während den Kontrolltieren 100 µL Maisöl ohne Wirkstoff verabreicht wurde. Die Injektionen wurden an Tag 2 und Tag 7 und anschließend einmal wöchentlich wiederholt. Alle Versuchstiere wurden mehrmals wöchentlich kontrolliert und regelmäßig gewogen.

Nach sechs Monaten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und seziert. Dün- und Dickdarm wurden entnommen und von Zökum und peripherem Fettgewebe getrennt. Das Darmlumen wurde durch mehrfaches Spülen mit PBS gereinigt. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden im Institut für Pathologie der Universität München horizontale Schnitte für histologische Färbungen angefertigt. Die Proben wurden jeweils mit Hämatoxylin-Eosin und durch die PAS-Reaktion (*Periodic Acid-Schiff*) nach Standardprotokollen gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 *BRAF*-Targeting in RKO

4.1.1 Verifikation der parentalen Zellen

RKO ist eine Mikrosatelliten-instabile Zelllinie, die chromosomal weitgehend stabil ist. Dennoch weist RKO keinen perfekt diploiden Chromosomensatz auf. Regelmäßig kommt es in RKO-Zellkulturen zur Ausbildung einzelner tetraploider Klone, die anhand ihrer abweichenden Morphologie und überdurchschnittlichen Größe identifiziert werden können¹¹⁹. Diese abweichenden Einzelzellen konnten in dem verwendeten Zellaliquot beobachtet werden.

Darüber hinaus zeigt RKO eine Multiplikation des Abschnittes von Chromosom 7, auf dem das *BRAF*-Gen lokalisiert ist. Aus diesem Grund besitzen RKO-Zellen ein Wildtyp- und zwei onkogen mutierte Allele für B-Raf. Durch Sequenzierung genomischer DNA und Auswertung der Sequenzhistogramme wurde dieser Genotyp in den verwendeten Zellen kontrolliert.

4.1.2 Isolierung und Expansion eines Subklones

Um einen homogenen genetischen Hintergrund zu gewährleisten und klonale Effekte zu minimieren, sollte aus RKO ein Subklon generiert werden. Nach der Vereinzelnung von RKO-Zellen und der Expansion der Einzelkolonien wurde der Klon RKO-E1 für die weiteren Experimente ausgewählt. RKO-E1 wies dabei eine RKO-typische Morphologie auf, zeigte im Vergleich mit anderen Einzelklonen eine durchschnittlich schnelle Proliferation und eine gute Vitalität nach Kryokonservierung. Der ursprüngliche Genotyp *BRAF*^{onc/onc/wt} wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Sensitivität von RKO-E1 auf G418-Sulfat und Hygromycin B wurde zu $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, bzw. $275 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt. Für die im Rahmen der *Targetings* durchgeführten Selektionen von infizierten RKO-E1 Zellen wurden Konzentrationen von $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (G418-Sulfat) und $0,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Hygromycin B) verwendet.

4.1.3 Klonierung der *Targeting*-Konstrukte

Für die Rekombination einzelner *BRAF*-Allele sollten provirale *Targeting*-Konstrukte hergestellt werden. Mit Hilfe genomischer DNA des RKO-Subklons RKO-E1 wurden die Homologiearme in einer PCR mit Phusion HotStart Polymerase amplifiziert. Die Konzentrationen von linkem (LHA) und rechtem Homologiearm (RHA) wurden in zwei sequenziellen Agarosegelen beurteilt und einander angeglichen. Zudem wurde je ein Aliquot der Neo- und

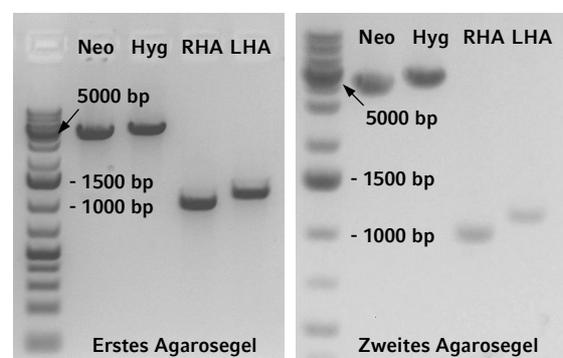
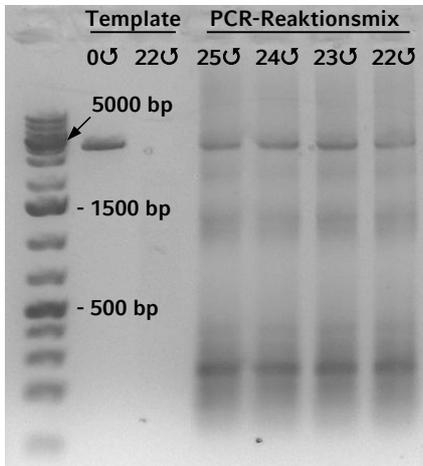


Abbildung 21: Vorbereitung der Fusions-PCR. Die DNA-Mengen von Resistenzkassetten und Homologiearmen wurden im Agarosegel verglichen und in ein Verhältnis von 1 : 4 gesetzt.

Hyg-Resistenzkassette aufgetragen, um äquimolare Konzentrationen einzustellen, entsprechend einem Verhältnis der Massenkonzentrationen von 1 : 4 (Homologiearme : Template-DNA) (Abbildung 21).

Die Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des Fusions-PCR-Produktes wurden sukzessive optimiert. Unter Verwendung eines Touchdown-PCR-Programmes für Phusion HotStart Polymerase konnten die



erwarteten Fragmente nach 22 Reaktionszyklen durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen und isoliert werden. Parallel sollte die hydrolytische Zersetzung der Template-Fragmente während der PCR-Zyklen analysiert werden. Dazu wurde eine Probe der Template-DNA mit PCR-Pufferlösung versetzt und dem Temperaturprotokoll unterzogen (Abbildung 22).

Die Fusions-PCR-Produkte aus jeweils zehn Reaktionsansätzen pro Resistenzkassette wurden im Agarosegel gereinigt und vereinigt. Nach einem Restriktionsverdau mit *NotI* wurden die Fragmente in das Plasmid pAAV-MCS einkloniert. Die korrekte Positionierung der Sequenzen in den *Targeting*-Konstrukten wurde in Restriktionsverdauen und durch Sequenzierung der Ligationstellen kontrolliert.

Abbildung 22: Etablierung der Fusions-PCR. Die Bedingungen der Fusions-PCR wurden soweit optimiert, dass nach 22 Zyklen eine deutliche Produktbande mit ca. 5 000 bp im Agarosegel sichtbar war.

4.1.4 Herstellung der Adeno-assoziierten Viren

Mit Hilfe des proviralen *Targeting*-Plasmids sollten in einer sogenannten *Packaging*-Zelllinie Adeno-assoziierte Viren hergestellt werden, um die Zielzellen zu infizieren. AAV-293 Zellen wurden mit dem *Targeting*-Konstrukt und den zwei proviralen Plasmiden pAAV-RC und pHelper kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden während der Inkubation regelmäßig mit einer Schale untransfizierter Kontrollzellen verglichen. Insbesondere wurde auf eine blasenförmig veränderte Morphologie geachtet, die sich laut Hersteller bei AAV-produzierenden Zellen einstellt¹²⁰. Während der zweitägigen Inkubationszeit wurden keine solchen morphologischen Unterschiede beobachtet. Dennoch konnte die Synthese infektiöser Viren nachgewiesen werden, indem es nach einer Testinfektion von RKO-E1 Zellen und der darauf folgenden Selektion innerhalb einer Woche zur Bildung resistenter Kolonien kam.

4.1.5 Etablierung von Zelllinien

Zur Etablierung eines Infektionsprotokolls für RKO-E1 mit Adeno-assoziierten Viren wurden unterschiedliche Volumina der Viruspartikel-haltigen Suspension und verschiedene Inkubationszeiten getestet.

Ein Optimum von durchschnittlich 1 200 resistenten Kolonien pro Infektion einer 10 cm-Zellkulturschale wurde mit jeweils 0,2 mL AAV-Suspension und anschließender Verdünnung in insgesamt zwei Flaschen Selektionsmedium (etwa 1,1 L Gesamtvolumen) erreicht. Nach mehreren Infektionsdurchgängen, wurden Knockout-Kandidaten im Rahmen der Screening-PCRs identifiziert. In den anschließenden Sequenzierungen konnte in einem der Kandidaten die Rekombination des *Targeting*-Konstruktes mit einem der onkogen mutierten Allele nachgewiesen werden. Aus diesem Zellklon wurde die Zelllinie RBOW (RKO-Derivat $BRAF^{onc/wt/del}$) etabliert.

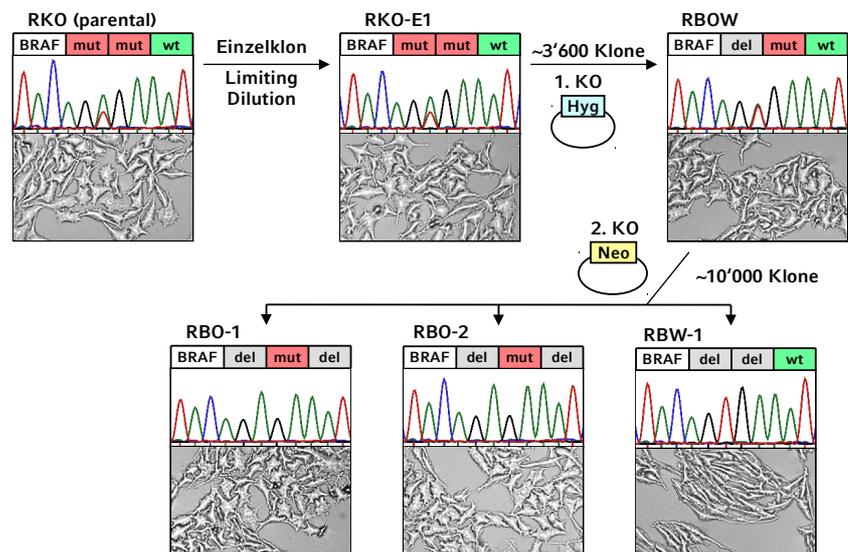


Abbildung 23: Herstellung RKO-abgeleiteter Klone durch Subklonierung und *BRAF*-Targeting. Durch stark verdünnte Aussaat wurde der Subklon RKO-E1 gewonnen. Die Etablierung der Knockout-Klone erfolgte in zwei *Targeting*-Runden. Der Genotyp der Klone wurde durch Sequenzierung verifiziert. Mikroskopien: 250 µm x 150 µm.

Um in RBOW ein weiteres Allel auszuschalten, wurde das Infektionsprotokoll mit dem Virus AAV-*BRAF*-Neo wiederholt. Unter insgesamt etwa 10 100 Kandidaten aus neun Infektionsdurchgängen wurden sieben erfolgreiche

sekundäre Knockouts identifiziert. Davon trugen sechs Klone die *BRAF*-Mutation und ein Klon das Wildtyp-Allel. Aus den positiv sequenzierten Klone wurden die Zelllinien RBO-1, RBO-2 (RKO-Derivate $BRAF^{onc/del/del}$) und RBW-1 (RKO-Derivat $BRAF^{wt/del/del}$) gewonnen (Abbildung 23).

4.1.6 Integrität der *BRAF*-Allele

Die Expression des *BRAF*-Gens von den verbliebenen Allelen wurde in Western-Blots kontrolliert und war in allen Zellklonen nachweisbar. Auch unter suboptimalen Kulturbedingungen, die durch eine Reduktion des Serumanteils im Nährmedium von 10 % auf 0,5 % hervorgerufen wurden, blieben die Expressionslevel und die Proteinmengen stabil (Abbildung 24).

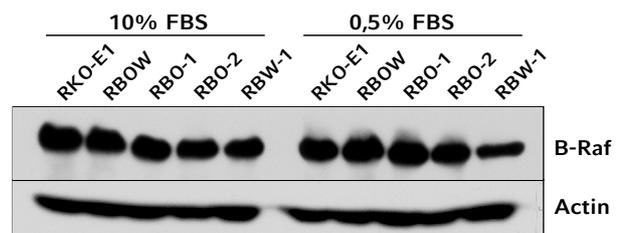


Abbildung 24: B-Raf Proteinlevel der RKO-abgeleiteten Zellklone. Die Expression des *BRAF*-Gens war in allen Zellklonen unter verschiedenen Kulturbedingungen in vergleichbaren Signalstärken nachweisbar.

4.1.7 Funktionale Verifikation des Knockouts

Die funktionale Bestätigung eines Knockouts auf Proteinebene kann bei Kinasen über die Phosphorylierung eines direkten oder indirekten Substrates erfolgen. Als direktes Substrat für B-Raf sollte die MAP-Kinase-Kinase Mek 1/2 bevorzugt für einen solchen Nachweis verwendet werden. Dennoch wird in der Mehrzahl

publizierter Arbeiten zur Beurteilung der B-Raf Aktivität die Phosphorylierung des im MAPK-Signalweg nachfolgenden Effektormoleküls Erk 1/2 bestimmt^{121 122 123}. Der Grund für die verbreitete Anwendung dieser indirekten Methode liegt in der Verfügbarkeit besonders sensibler und zuverlässiger Antikörper gegen phospho-Erk 1/2 und pan Erk 1/2. Nach sorgfältiger Optimierung der experimentellen Protokolle konnten im Rahmen dieser Arbeit beide Methoden zum Nachweis der B-Raf Kinase-Aktivität etabliert werden und wurden zur gegenseitigen Verifikation parallel eingesetzt, soweit dies sinnvoll erschien.

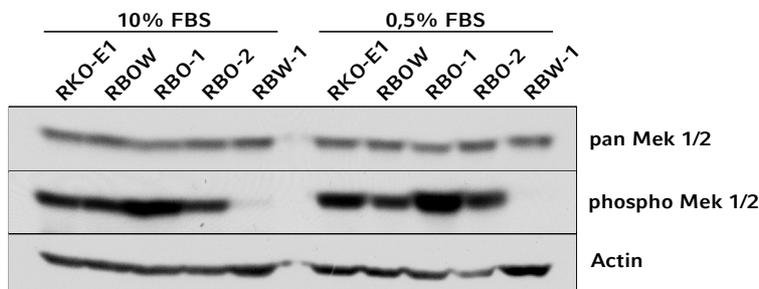


Abbildung 25: Mek 1/2-Phosphorylierung. RBW-1 zeigte sowohl mit 10 % FBS, als auch mit 0,5 % FBS reduzierte Mengen an phosphoryliertem Mek 1/2 im Vergleich zu Zellklonen mit V600E-Mutation.

Zellklonen mit mindestens einem mutierten Allel eine wesentlich schwächere Phosphorylierung von Mek 1/2 (Abbildung 25).

In Phosphorylierungs-spezifischen Western-Blots wurde die B-Raf Kinaseaktivität am direkten Substrat Mek 1/2 unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht. Bei vergleichbaren Aktin-Mengen wurden in allen Zellklonen auch vergleichbare Gesamtmengen an Mek 1/2 detektiert. Der Zellklon RBW-1 zeigt im Vergleich zu

Zur Bestätigung dieser Daten und zur besseren Vergleichbarkeit mit publizierten Arbeiten wurde die Kinaseaktivität von B-Raf auch auf der nächst tieferen Stufe des Signalwegs untersucht. In Hinblick auf weitere funktionelle Experimente wurden erneut Lysate aus Zellen verwendet, die bei unterschiedlichen Kulturbedingungen inkubiert wurden. Bei vergleichbar starken Signalen nach Inkubation mit Antikörpern gegen Aktin und pan Erk 1/2 zeigte sich für RBW-1 auch auf dieser Ebene eine abweichende Phosphorylierung. Während die Signale für RKO-E1, RBOW, RBO-1 und RBO-2 wiederum einheitlich stark waren, wies der Wildtyp-Klon erneut unter beiden untersuchten Kulturbedingungen eine verminderte Aktivierung des Zielmoleküls auf (Abbildung 26).

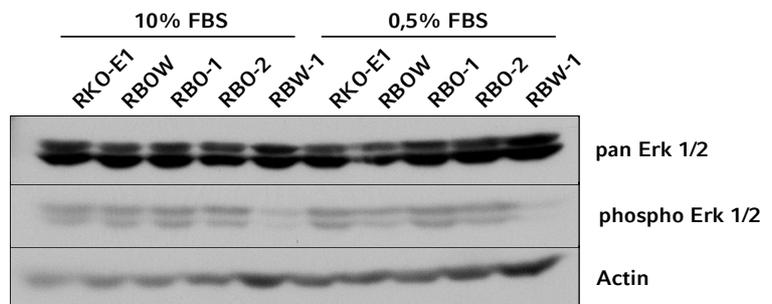


Abbildung 26: Erk 1/2-Phosphorylierung. Auch auf Ebene von Erk 1/2 zeigte RBW-1 unabhängig von der eingesetzten Serumkonzentration reduzierte Phosphorylierungslevel.

4.2 Zellbiologische Phänotypen

4.2.1 Proliferation

Während der Etablierung der aus RKO abgeleiteten Zellklone und zur Vorbereitung der einzelnen Experimente wurden in der Regel Standard-Expansionsprotokolle angewendet. Die Zellen wurden

möglichst bei Erreichen eines konfluenten Wachstums in niedrigen Verdünnungen frisch ausgesät. Im routinemäßigen Umgang mit den etablierten Zelllinien wurden keine Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit festgestellt. Nachdem die vom EGF-Rezeptor abhängigen Signalkaskaden aber häufig Wachstumssignale vermitteln, wurden die Proliferationsraten gezielt unter abnehmenden Serumkonzentrationen bestimmt.

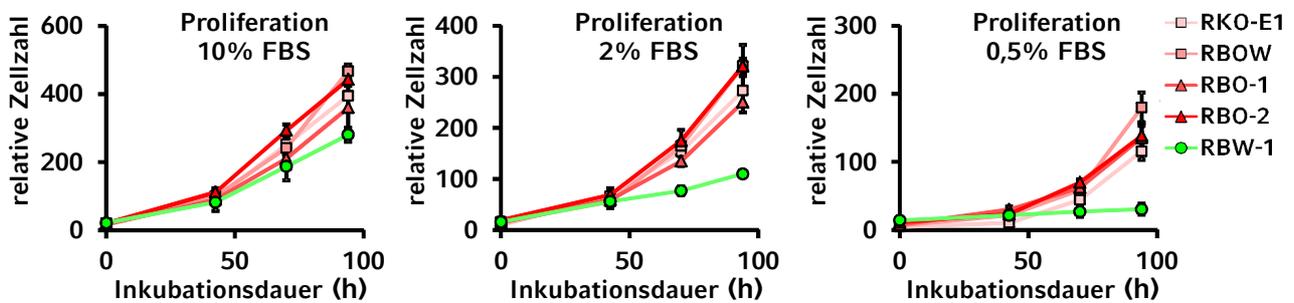


Abbildung 27: RBW-1 zeigt erniedrigte Proliferationsraten unter Hungerbedingungen. Zur Auswertung der Proliferationsassays wurde die relative Zellzahl gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Mit sinkenden Serumkonzentrationen zeigte RBW-1 eine dosisabhängig sinkende Proliferation im Vergleich zu mutierten Klonen.

B-Raf^{V600E} exprimierende Zellen wiesen bei allen untersuchten Kulturbedingungen untereinander ähnliche Proliferationsraten auf. RBW-1 zeigten dagegen nur unter Standardbedingungen eine mit den *BRAF*-mutierten Zellen vergleichbar starke Proliferation. Mit zunehmender Serumreduktion kam es in der Wildtyp-Zelllinie zu einer dosisabhängigen Verlangsamung des Zellwachstums, das schließlich bei einem Serumanteil von 0,5 % nahezu vollständig eingestellt wurde (Abbildung 27).

4.2.2 Stoffwechsel

Zur Verifikation der Proliferationsdaten wurde die zelluläre Vitalität in den RKO-abgeleiteten Klonen mit Alamarblau bestimmt. Onkogen mutierte Zellen setzten den Farbstoff sowohl im Vollmedium, als auch unter ungünstigen Bedingungen schnell um und erreichten nach kurzer Zeit das maximale Fluoreszenzniveau. RBW-1 Zellen zeigten unter Standardbedingungen zunächst die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit für die Alamarblau-Reduktion wie die Kontrollzellen. Nach Serumentzug wiesen sie dagegen eine stark reduzierte Umsetzung des Fluorophors auf, dessen Signal hier zwar weiterhin stetig anstieg, aber innerhalb einer Stunde das Sättigungsniveau nicht erreichte (Abbildung 28).

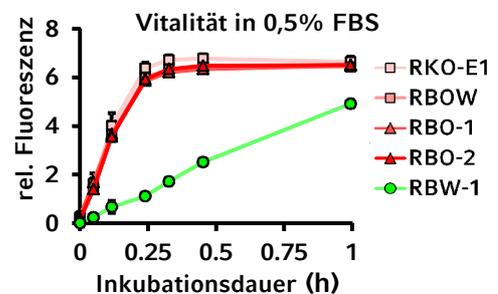


Abbildung 28: RBW-1 ist unter Serumreduktion weniger vital als Kontrollzellen. Im Vitalitätsassay mit Alamarblau wurde der relative Umsatz des Farbstoffs fluorimetrisch bestimmt und gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Dabei zeigte RBW-1 über den Versuchszeitraum von einer Stunde einen deutlich langsameren Umsatz des Fluorophors und damit eine geringere zelluläre Vitalität.

4.2.3 Seneszenz

Qualitative Auswertung

Als ein naheliegender Mechanismus der verminderten Proliferation wurde in einem β -Galaktosidase-Assay die zelluläre Seneszenz der Knockout-Klone untersucht. In der lichtmikroskopischen Auswertung wurden in allen untersuchten Proben einzelne Zellen mit Seneszenz-assoziiierter Galaktosidase-Aktivität gefunden. Hierbei waren nur geringe Unterschiede in der Häufigkeit positiv angefärbter Zellen zwischen RBW-1 und den Klonen mit mutiertem *BRAF*-Allel bei 10 % FBS erkennbar. Eine ebenfalls nur leichte Zunahme der Seneszenz in RBW-1 wurde mit 0,5 % FBS festgestellt (Abbildung 29). Insgesamt bewegte sich der Anzahl positiv gefärbter Zellen in allen Proben auf einem niedrigen Niveau.

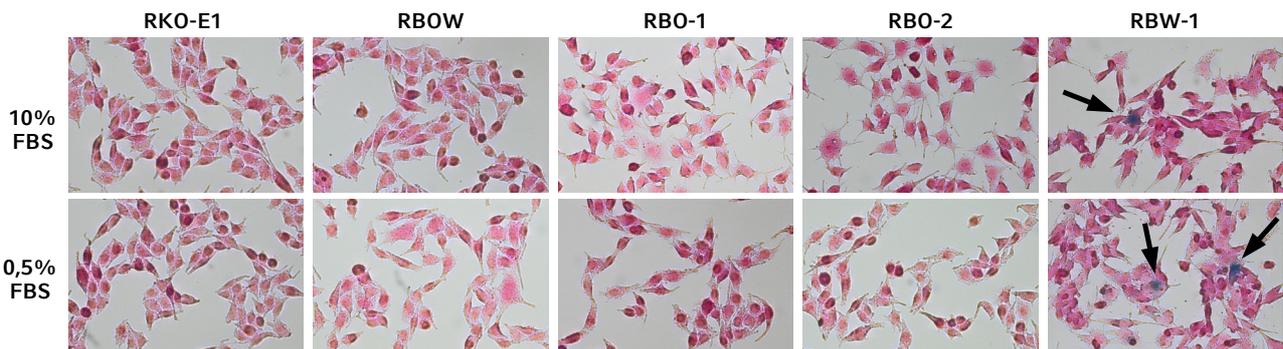


Abbildung 29: Nachweis der Seneszenz-assoziierten Galaktosidase-Aktivität. Seneszente Zellen wurden durch Blaufärbung und Gegenfärbung mit Azokarminrot identifiziert. RBW-1 zeigte geringfügig mehr seneszente Zellen als die Vergleichszellen (schwarze Pfeile). Mikroskopien: 150 μm x 100 μm .

Quantitative Auswertung

Nach der qualitativen Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl Seneszenz-positiver Zellen deren Anteil an der Gesamtpopulation durch Auszählung mehrerer Gesichtsfelder quantifiziert. In Zellklonen mit V600E-mutiertem Allel überstieg die seneszente Fraktion weder in Vollmedium, noch unter Serumangel einen Anteil von 1 %. In RBW-1 liegt die basale Seneszenz unter Standardbedingungen bei etwa 2 % und steigt im Hungermedium auf 3,5 % an (Abbildung 30).

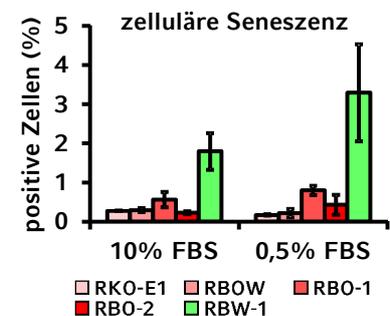


Abbildung 30: Bestimmung des Anteils seneszenter Zellen. Anhand der mikroskopischen Bilder wurde die zelluläre Seneszenz durch das Auszählen einzelner Ausschnitte quantifiziert. Das Diagramm zeigt für jede Probe den Anteil Seneszenz-positiver Zellen in Prozent als Mittelwert aus jeweils fünf Bildausschnitten.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Transkription Seneszenz-assoziiierter Gener durch quantitative RT-PCR untersucht¹²⁴. Weder das *TP53*-Gen, das für das Tumorphprotein p53 kodiert, noch *BNIP3L* oder *SMARCB1* waren durch die geänderten Kulturbedingungen differenziell in den Zellklonen reguliert. Transkripte der Gene *MKI67*, *CDKN2A* und *IGFBP7*, die für Ki67, p16^{INK4A} und einen weiteren Seneszenzmarker kodieren, waren in keiner der untersuchten Proben nachweisbar (ohne Abbildung).

4.2.4 Zellzyklus

Die Zellzyklen parentaler und Knockout-Zellen, die unter Vollmedium und Serummangel inkubiert wurden, wurden per Durchflusszytometrie analysiert. Die Proben, die mit 10 % FBS versorgt wurden, wiesen untereinander keine größeren Unterschiede auf und zeigten einheitlich einen gut definierten Zellzyklus. In den Histogrammen waren nur sehr schwache Signale im sub G1-Bereich erkennbar und damit keine relevanten Mengen abgestorbener Zellen nachweisbar. Des Weiteren fiel ein relativ starkes Signal für die G2/M-Phase auf, das auf eine besonders hohe proliferative Aktivität schließen lässt. In Übereinstimmung mit den Daten aus den Proliferationsassays waren die S- und G2/M-Fractionen im serumreduzierten Medium deutlich kleiner. Darüber hinaus kam es in RBW-1 unter den veränderten Kulturbedingungen zu einem sprunghaften Anstieg des Anteils an Zellen in der sub G1-Phase (Abbildung 31).

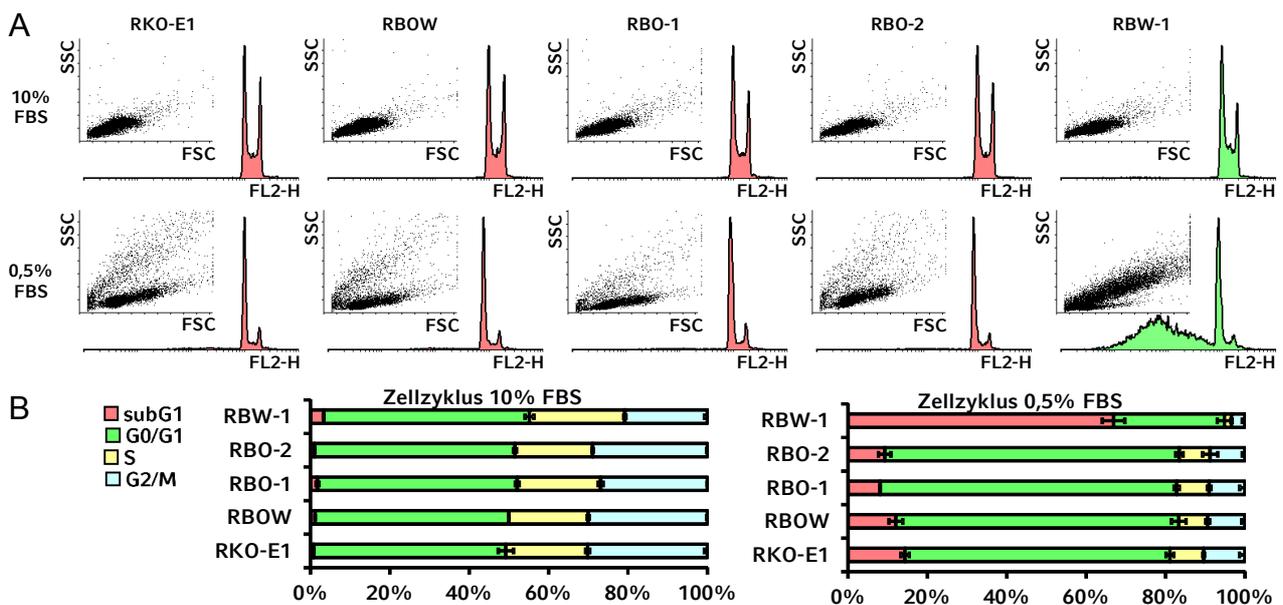


Abbildung 31: In der Zellzyklus-Analyse zeigte RBW-1 eine erhöhte Zelltodrate nach Serumentzug. Aliquots aller Zellklone wurden für fünf Tage in Standard- und Hungermedium kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. A: Die Histogramme zeigen die Anzahl der Ereignisse im FL2-H Kanal gegen die Signalintensität und als Einblendung das jeweilige Punktdiagramm mit SSC-Signal gegen FSC-Signal. Als stark proliferierende Zellen zeigten die RKO-abgeleiteten Knockout-Klone unter guten Bedingungen hohe Maxima für die G2/M-Fraktion (oben). Nach Inkubation mit Serum-reduziertem Medium nahm das G2/M-Signal deutlich ab (unten). Zudem wiesen RBW-1 einen starken Anstieg der sub-G1 Fraktion und damit eine hohe Zelltodrate auf. B: Die quantitative Auswertung der Histogramme bestätigte sowohl die Abhängigkeit der Proliferationsrate von der Serumkonzentration, als auch den Anstieg der sub-G1 Fraktion in RBW-1 in Medium mit 0,5 % Serum.

4.3 Mechanismus Zelltod

Nachdem in der durchflusszytometrischen Analyse ein starker Anstieg der sub G1-Fraktion in mit 0,5 % FBS inkubierten RBW-1 Zellen beobachtet wurde, sollte der zu Grunde liegende Mechanismus für das Absterben der Zellen analysiert werden. Die Detektion von sub G1-Ereignissen im Durchflusszytometer kann durch schwach gefärbte und kleine Partikel hervorgerufen werden. Ursache hierfür sind der DNA-Abbau in sterbenden Zellen und die im voranschreitenden Abbauprozess entstehenden Zelltrümmer. Dem Auftreten von Zelltrümmern können verschiedene zelluläre Vorgänge zu Grunde liegen, die sich nicht ohne Weiteres anhand der Zellzyklusanalyse voneinander unterscheiden lassen.

Nekrose

Zum Nachweis des für nekrotische Zellen typischen Anschwellens wurden unterschiedlich inkubierte RBW-1 Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Für eine nekrotische Positivkontrolle wurde einem der Aliquots 24 Stunden vor Analyse Wasserstoffperoxid zu einer finalen Konzentration von $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ zugesetzt. In einem weiteren Aliquot wurde parallel durch $10 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ des Apoptosestimulanz TRAIL gezielt Apoptose induziert. Als Kontrollzellen mit intaktem Zellzyklus dienten unter Standardbedingungen inkubierte RBW-1. Das vorwärtige Streulicht der G0/G1-Fractionen in den drei Kontrollen wurde mit den Werten aus 0,5 % FBS-behandelten Zellen verglichen.

Mit Wasserstoffperoxid behandelte Zellen zeigten eine vielfach intensivere Vorwärtsstreuung als basale RBW-1. Der G0/G1-Peak der apoptotischen Zellen wies im Vergleich dazu eine nur moderat erhöhte Intensität auf. Das vorwärtige Streulicht der mit Serum-reduziertem Medium inkubierten Zellen lag etwa auf dem Niveau der apoptotischen Zellen. Demnach konnte in Folge des Serumentzugs keine Zunahme des zellulären Volumens beobachtet werden (Abbildung 32).

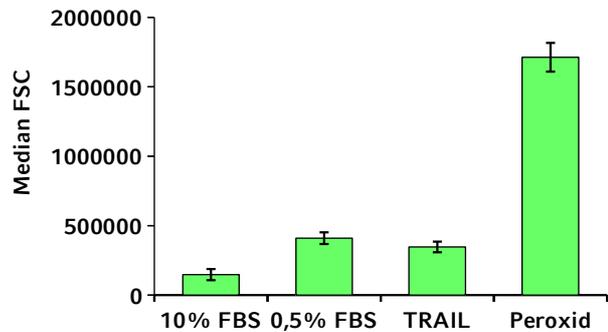


Abbildung 32: Nachweis des Anschwellens nekrotischer Zellen. Die Vorwärtsstreuung differenziell inkubierter RBW-1 Zellen wurde als Maß für den Zelldurchmesser verglichen. RBW-1 zeigten ähnliche Durchmesser nach Inkubation mit 0,5 % FBS und nach Apoptose-Stimulation mit TRAIL. Das für Nekrose typische Anschwellen der Zellen konnte nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid beobachtet werden, nicht jedoch mit 0,5 % FBS.

Apoptose

Um die Zellen auf Apoptose zu untersuchen, wurden Proteinlysate parallel zu den durchflusszytometrisch analysierten Proben hergestellt. In Western-Blots wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen bekannte Apoptosemediatoren untersucht, ob Caspase-Kaskaden oder einschlägige apoptotische Signalwege in den Zellen aktiviert waren.

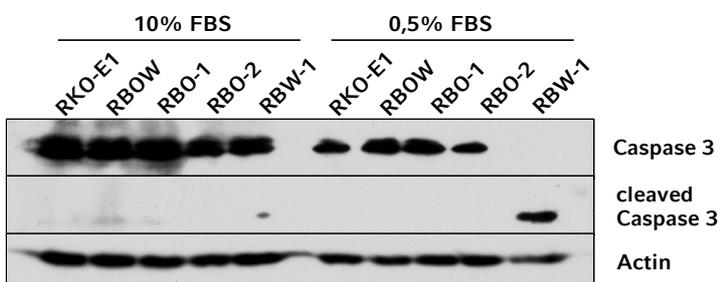


Abbildung 33: Nachweis Caspase-abhängiger Apoptose im Western-Blot. In Zelllysaten aus RBW-1 zeigte sich eine Aktivierung der Apoptose-vermittelnden Caspase 3 nach Inkubation in Hungermedium.

Im Western-Blot gegen die zentrale Caspase 3 zeigte sich für alle mit Vollmedium inkubierten Zellen eine Doppelbande, die der ungespaltenen Caspase zugeordnet werden konnte. In Serum-reduziertem Medium wurde dieses Signal deutlich schwächer und war in RBW-1 nicht mehr nachweisbar. Dafür zeigte die Wildtyp-Zelllinie die charakteristische Abbaubande für Caspase 3 in ihrer gespaltenen, aktiven Form (Abbildung 33).

Als weitere Apoptosemarker wurden Caspase 8, Cytochrom C und der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21^{Cip1} in den Lysaten analysiert. Hierbei zeigten sich keine abweichenden Proteinspiegel zwischen den Zellklonen und keine Unterschiede zwischen den untersuchten Kulturbedingungen (Abbildung 34).

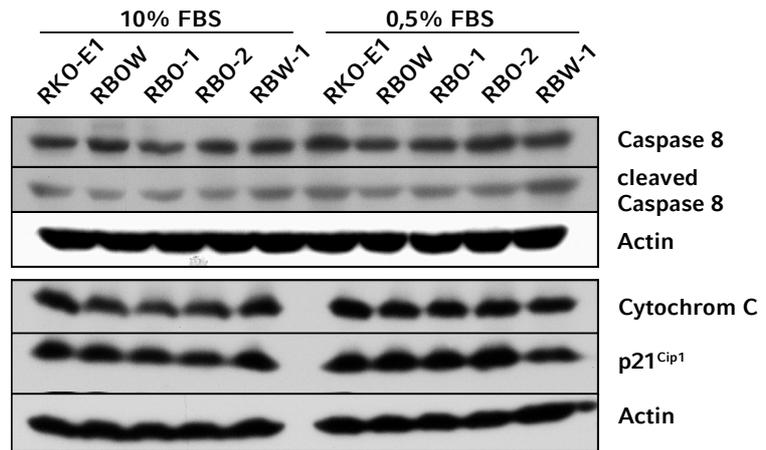


Abbildung 34: Detektion von Apoptose-Markern im Western-Blot. Aliquots differenziell inkubierter Zellen wurden lysiert und zur weiteren mechanistischen Aufklärung der Apoptose im Western-Blot untersucht. Die Zelllinien zeigten weder in Vollmedium, noch in Medium mit reduziertem Serumanteil unterschiedliche Level für Caspase 8, Cytochrom C und p21^{Cip1}.

4.3.1 Zelldichte-Effekte

Im Rahmen von Probenpräparationen und funktionellen Experimenten wurden in einzelnen Fällen besonders lange Inkubationszeiten benötigt, die mit Standardprotokollen zur Inkubation der Zellen nicht erreicht werden konnten. Demnach wurden die Protokolle zu Kultivierung und Expansion der Zellen gegebenenfalls modifiziert. Hierbei kam es je nach experimentellen Anforderungen sowohl zur Aussaat in hohen Verdünnungen, als auch zum hyperkonfluenten Wachstum der Zellen. In beiden Fällen wurden weitere zellbiologische Phänotypen entdeckt, die anschließend näher charakterisiert wurden.

Maximale Konfluenz

Zur Bestimmung der maximalen Zelldichte wurden die Zellen bis zur Hyperkonfluenz inkubiert und täglich im Hämacytometer quantifiziert. Alle Zelllinien mit V600E-Mutation erreichten Maxima von 140 Zellen · μm⁻² bis 160 Zellen · μm⁻² während der Inkubation. Dagegen proliferierten RBW-1 bis etwa 80 Zellen · μm⁻² am Punkt der höchsten Konfluenz und zeigten demnach Anzeichen einer Kontaktinhibition (Abbildung 35 links).

Im Folgenden wurde geprüft, ob die Differenz in der maximalen Konfluenz zwischen Wildtyp- und mutierten Zellen durch unterschiedliche Zelldurchmesser verursacht wird. Dazu wurden Aliquots im Durchflusszytometer gemessen und die Vorwärtstreueung als Maß für das Partikelvolumen analysiert. Für die G0/G1-Fractionen der Zellklone wurden die geometrischen Mittelwerte der Strahlungsintensitäten gebildet

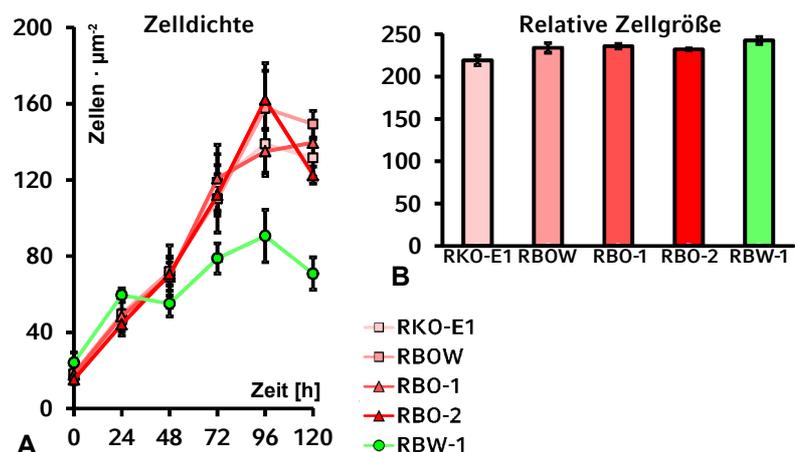


Abbildung 35: Nachweis einer Kontaktinhibition in RBW-1 über die maximale Zelldichte. In einem Proliferationsassay wurden Zellen mit 70 % Konfluenz ausgesät und für fünf Tage inkubiert (A). RBW-1 Zellen zeigten eine niedrigere Zelldichte im hyperkonfluenten Wachstum. Parallel wurde im Durchflusszytometer das relative vorwärtige Streulich als Maß für die Zellgröße gemessen (B). Die erniedrigte Zelldichte in RBW-1 war nicht auf Unterschiede in der Zellgröße zurückzuführen.

und verglichen. Mit einem Unterschied von weniger als 10 % zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert weisen die Zelllinien eine vergleichbare Zellgröße auf (Abbildung 35 rechts).

Aktivität des Akt-Signalwegs

Nachdem Zelldichte-Effekte wie Kontaktinhibitionen über den Akt/mTOR-Signalweg verlaufen können, wurde dessen Aktivierung untersucht¹²⁵. Durch die gleiche Beladung mit Zelllysaten wurden zwei identische Gele in einer parallel durchgeführten SDS-PAGE hergestellt. Nach dem Western-Blot wurde sequenziell mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Akt, pan Akt und Aktin die Aktivität des Akt-Signals bestimmt. Dabei wurde einmal die initiale Phosphorylierung an Threonin³⁰⁸ untersucht, während die zweite Membran mit einem Antikörper gegen Serin⁴⁷³-phosphoryliertes Akt inkubiert wurde.

In allen Zelllinien wurde eine vergleichbare Phosphorylierung des T³⁰⁸-Restes beobachtet. Die Intensität des Signals blieb in etwa konstant zwischen Proben, die in 10 % Serum kultiviert wurden und solchen, die mit Hungermedium inkubiert wurden. Dagegen war Serin⁴⁷³ bereits unter Standard-Kulturbedingungen in RBW-1 deutlich schwächer phosphoryliert, als in den Vergleichszellen. Nach Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium nahm die S⁴⁷³-Phosphorylierung in allen Zellklonen stark ab, blieb jedoch für RBW-1 weiterhin niedriger als in mutierten Zellen (Abbildung 36).

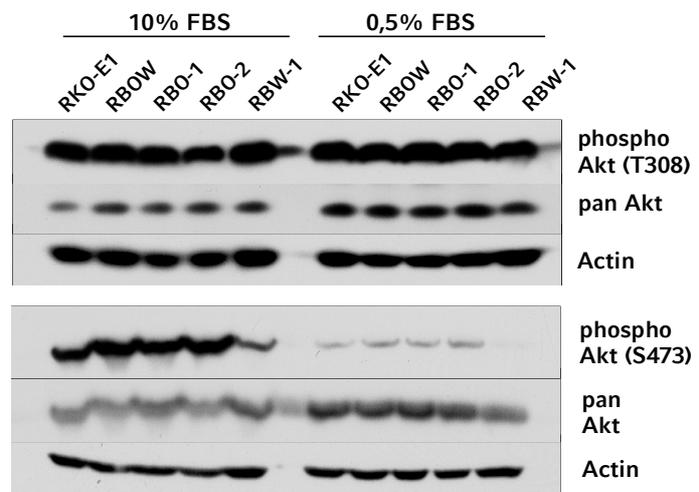


Abbildung 36: RBW-1 zeigte eine reduzierte Phosphorylierung von Akt an Serin⁴⁷³. Zellen wurden mit Normal- oder Hungermedium inkubiert und lysiert. Im Western-Blot wurden beide Aktivierungsstufen von Akt untersucht. Durch Serummangel wurde in den RKO-abgeleiteten Klonen die Phosphorylierung von Akt nur auf Ebene von Serin⁴⁷³, nicht jedoch an Tyrosin³⁰⁸ reduziert. RBW-1 zeigte im Vergleich mit den Kontrollklonen sowohl mit 10% FBS, als auch in Hungermedium eine reduzierte Phosphorylierung für Akt auf Ebene von Serin⁴⁷³.

Morphologie

Während der Kultivierung der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch auf Veränderungen kontrolliert. Bei der Verwendung üblicher Passagierungsprotokolle waren weder an vereinzelt Zellen, noch in höheren Zelldichten morphologische Unterschiede zwischen den Zellklonen erkennbar. Hingegen wiesen RBW-1 abweichende Zellformen auf, wenn ein Wachstum in Schollen herbeigeführt wurde. Nach Aussaat der Zellen in hohen Verdünnungen von etwa 1 : 15 wurden in mittleren Konfluenzstadien typische Zellhäufungen beobachtet. Die Zellen wuchsen in voneinander abgegrenzten Arealen konfluent, ohne jedoch bereits Kolonien mit hyperkonfluenten Zentren zu bilden. Unter diesen speziellen Bedingungen wiesen RBW-1 eine deutlich verstärkte Spindelform im Vergleich zu den restlichen Zellklonen oder zur normalen Kultivierung auf. Darüber hinaus war eine kooperative Ausrichtung der RBW-1 Zellen innerhalb der Zellhäufungen zu beobachten, in der benachbarte Zellen weitgehend parallel zueinander angeordnet waren (Abbildung 23).

4.4 Chemosensitivitäten

Nach der Identifikation und Charakterisierung der zellbiologischen Unterschiede zwischen RBW-1 und Zellklonen mit B-Raf^{V600E} sollten deren mögliche Konsequenzen auf die Behandlung der Zellen mit chemotherapeutischen Wirkstoffen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen in Chemosensitivitäts-Assays über mehrere Tage mit verschiedenen Substanzen inkubiert und anschließend quantifiziert.

4.4.1 Klassische Chemotherapeutika

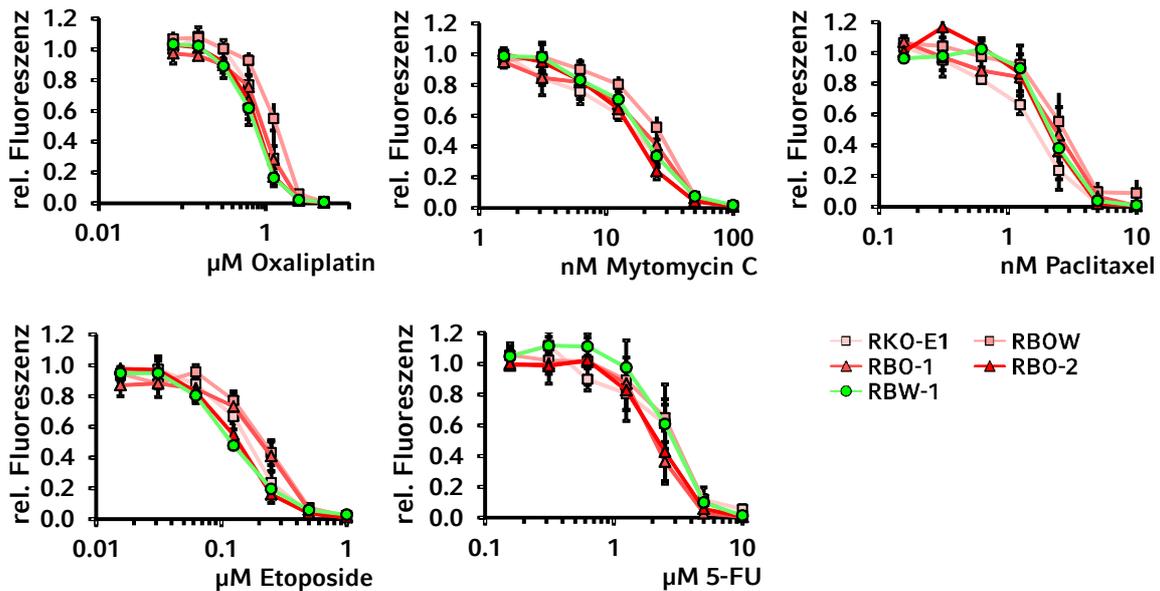


Abbildung 37: Mit klassischen Chemotherapeutika wurden keine differenziellen Effekte für die Knockout-Zellklone beobachtet. In Chemosensitivitätsassays wurden die RKO-abgeleiteten *BRAF*-Knockout-Klone mit Oxaliplatin, Mitomycin C, Paclitaxel, Etoposide oder 5-Fluoruracil behandelt. Es wurden keine Unterschiede im Ansprechen auf die Wirkstoffe beobachtet.

In den Chemosensitivitätsassays wurde untersucht, ob RBW-1 im Vergleich zu den mutierten Zelllinien ein verändertes Ansprechen auf einzelne Therapeutika zeigten. Zunächst wurden konventionelle chemotherapeutische Wirkstoffe eingesetzt, die im klinischen Alltag als gut etabliert gelten und häufig eingesetzt werden. Zum einen wurden Oxaliplatin und Mitomycin C als Vertreter der *Crosslinker*, sowie Paclitaxel aus der Gruppe der Taxane ausgewählt. Zum anderen kamen stellvertretend für die Inhibitoren des Nukleinsäure-Stoffwechsels Etoposid und 5-Fluoruracil zum Einsatz. Nach sechstägiger Inkubation mit den Wirkstoffen wurde keine differenzielle Sensitivität zwischen den Zelllinien festgestellt. Insbesondere im horizontalen Abstand der LC₅₀-Konzentration liegen die Kurven im Rahmen der Standardabweichung gleich auf. Auch in den Bereichen hoher und niedriger Konzentrationen weicht weder RBW-1, noch einer der *BRAF*-mutierten Klone wesentlich von den Werten der parentalen Zelllinie RKO-E1 ab (Abbildung 37).

4.4.2 EGFR-Antikörper

Im Folgenden sollte der Effekt des EGFR-Antikörpers Cetuximab im Chemosensitivitätsassay untersucht werden. Vorbereitend hierzu wurde die Expression des Rezeptors in den Zellklonen überprüft. Anhand publizierter Daten wurde eine deutlich nachweisbare Expression zumindest für die parentalen Zellen erwartet¹²⁶. Im Western-Blot wurden in allen Lysaten diskrete Banden für EGFR erhalten. In den mit 0,5 % FBS inkubierten Proben waren die EGFR-Signale bei gleichen Mengen an Gesamtprotein deutlich stärker als in Proben aus Vollmedium (Abbildung 38).

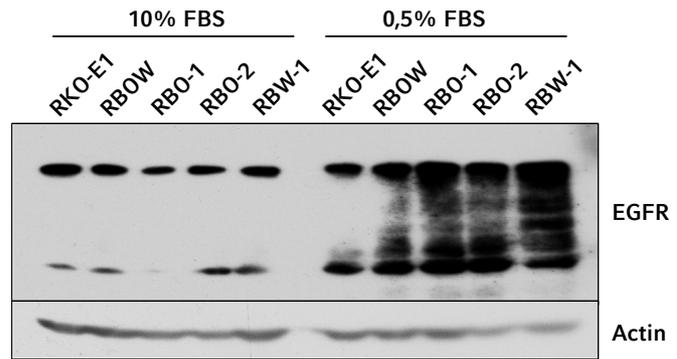


Abbildung 38: EGFR wurde in allen Zellklonen exprimiert. Die Expression des EGF-Rezeptorgens war in allen Zelllinien auf Proteinebene nachweisbar. Unter Serumreduktion kam es zu einer verstärkten Expression des Wachstumsrezeptors.

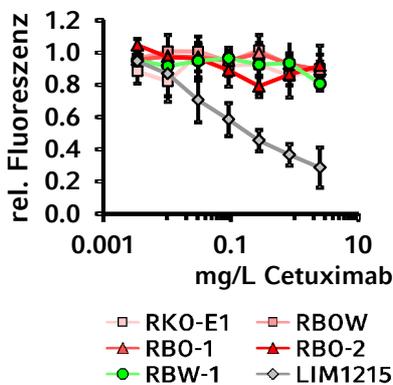


Abbildung 39: Cetuximab-Resistenz der Zellklone. Keine der Knockout-Zelllinien zeigte eine Sensitivität gegenüber dem EGFR-Antikörper Cetuximab im Vergleich zu Positivkontrolle (LIM1215).

Ansprechverhalten zwischen $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ und $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cetuximab, während die RKO-Derivate unverändert resistent waren (Abbildung 39).

4.4.3 B-Raf Inhibitoren

In weiteren Sensitivitätsassays wurden Reagenzien aus der Gruppe der B-Raf Inhibitoren eingesetzt. Für den Multikinase-Inhibitor Sorafenib wurde dabei kein differenzielles Ansprechen der Zelllinien beobachtet.

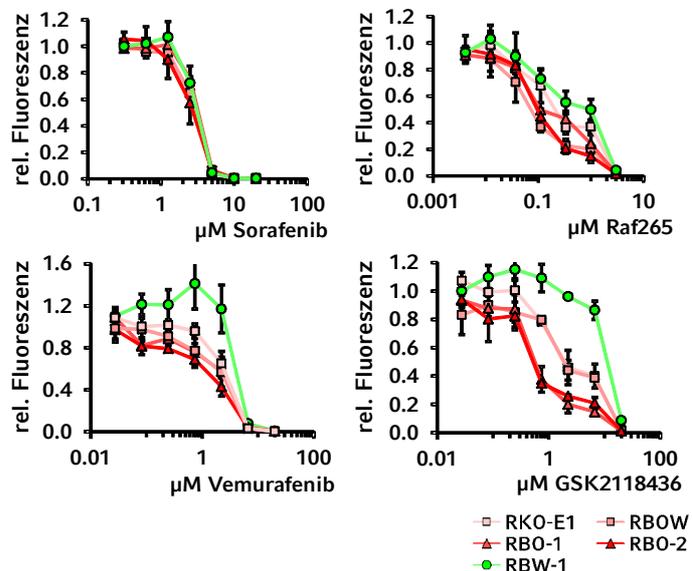


Abbildung 40: Behandlung der Zellen mit B-Raf Inhibitoren. Für Sorafenib wurde kein differenzielles Ansprechen der Zellklone gefunden. Bei der Behandlung mit RAF265 zeigte sich ein Trend hin zu höheren Sensitivitäten für BRAF-mutierte Klone. Bei Vemurafenib und GSK2118436 wurden Unterschiede um den Faktor 1,8 bzw. 5,9 beobachtet.

Der im Vergleich dazu deutlich selektivere Raf-Inhibitor RAF265 zeigte ebenfalls für keine der Knockout-Zelllinien eine signifikante Abweichung von den Werten des parentalen Zellklons. Im Gegensatz zu Sorafenib und den zuvor getesteten Wirkstoffen zeigten RBW-1 jedoch bei allen Konzentrationen eine geringfügig höhere Proliferation als Klone mit V600E-Mutation. Der daraus resultierende Unterschied der LC₅₀-Konzentrationen bewegte sich aber im Rahmen der Standardabweichungen zwischen den Zelllinien.

Als weitere moderne B-Raf Inhibitoren der jüngsten Generation wurden das bereits für Hautkrebs-Patienten zugelassene Vemurafenib und der Zulassungskandidat GSK2118436 getestet. Für beide Substanzen wurde ein eindeutig differenzielles Ansprechen der Zellklone gefunden. Die gefundene LC₅₀-Konzentration liegt in RBW-1 für Vemurafenib um den Faktor 1,8 und für GSK2118436 um den Faktor 5,9 höher als in den Ausgangszellen (Abbildung 40).

4.4.4 Spezifität der Inhibitoren

Im Western-Blot sollte untersucht werden, ob die gefundenen Unterschiede in der Chemosensitivität auf der spezifischen Regulation des B-Raf/Mek/Erk-Signalweges beruhten. Dazu sollten die Zellen mit RAF265, Vemurafenib und GSK2118436 als denjenigen B-Raf Inhibitoren inkubiert werden, die eine gute Spezifität erwarten ließen. Die im Proliferationsassay als wirksam gefundenen Konzentrationen konnten dabei nicht ohne weiteres vom 96-well Format auf 10 cm Zellkulturschalen übertragen werden. Viele Inhibitorsubstanzen zeigen eine unspezifische Bindung an Proteine im serumhaltigen Zellkulturmedium. Daher spielt das Verhältnis von Zellzahl zu Mediumvolumen eine entscheidende Rolle bei der Konzentrationsfindung (Tabelle 2).

Qualitative Auswertung

Für Vemurafenib ist eine hohe Affinität zu Serumproteinen in der Literatur beschrieben, für die anderen Inhibitor-Kandidaten waren keine publizierten Daten verfügbar¹⁰⁸. Vor den Western-Blots wurden daher in einem *Colony Forming Assay* die wirksamen Konzentrationen der Inhibitoren im 6-well Format ermittelt. Für Vemurafenib und GSK2118436 wurden fünf Konzentrationen von 60 µmol · L⁻¹ in jeweils neunfacher Verdünnung absteigend eingesetzt. Für RAF265 wurde eine analoge Verdünnungsreihe, beginnend mit 10 µmol · L⁻¹, angewendet. In einer qualitativen Auswertung wurden diejenigen Konzentrationen ermittelt, bei denen die Koloniebildung um etwa 50 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen zurückging. Für Vemurafenib wurden 10 µmol · L⁻¹, für die anderen beiden Inhibitoren 1 µmol · L⁻¹ als Konzentration für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

Nach einer Inkubation über 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern auf die Signalwegsaktivität unterhalb von B-Raf untersucht. Jeweils ein basales Zellaliquot diente als Positivkontrolle. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Wildtyp-Zelllinie RBW-1 mitgeführt (Abbildung 41).

Der Inhibitor RAF265 zeigte in den Western-Blots für alle Zelllinien mit V600E-Mutation eine Abnahme des phospho-Mek 1/2 Signals, aber keinen Zelllinien-übergreifenden Effekt für phospho-Erk 1/2.

Für Vemurafenib zeigte sich ebenfalls in allen mutierten Zellklonen eine Inhibition der Mek 1/2-Phosphorylierung. Für die nachgeschalteten Kinasen Erk 1 und Erk 2 wurde in den Vemurafenib-inkubierten Proben analog zu RAF265 keine durchgängige Inhibition der Aktivierung gefunden.

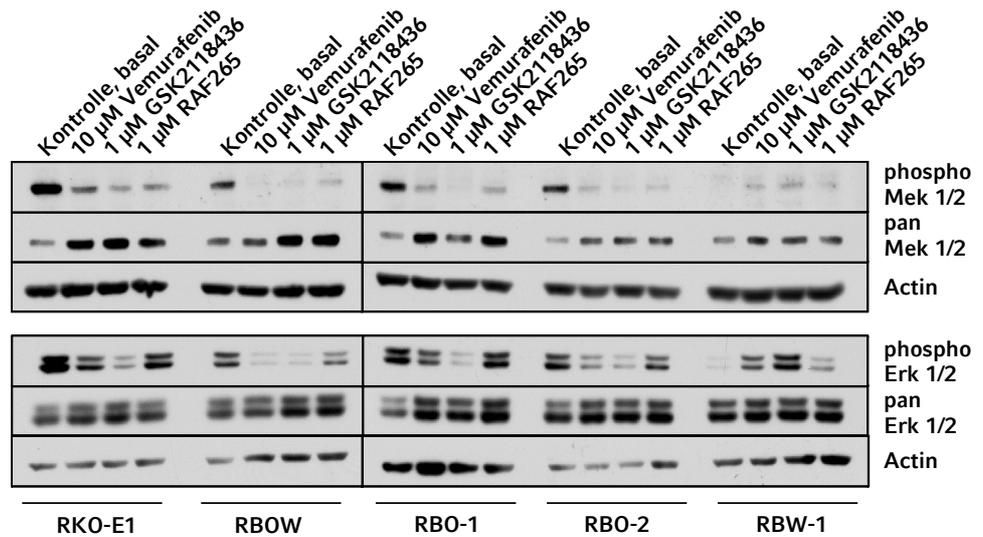


Abbildung 41: Inhibition des Mek/Erk-Signalweges durch B-Raf Inhibitoren. Nach Inkubation der RKO-Derivate mit B-Raf Inhibitoren wurde im Western-Blot die Aktivität des B-Raf nachgeschalteten Signalweges auf Ebene von Mek 1/2 und Erk 1/2 untersucht. Auf beiden Stufen der Kaskade kam es zu einer Reduktion der Phosphorylierung in Zellklonen mit V600E-Mutation. Dagegen wurde das Signal im Wildtyp-Klon RBW-1 in Anwesenheit der Inhibitoren verstärkt.

GSK2118436 zeigte über beide Stufen des Signalweges eine deutliche Senkung der Effektor-Phosphorylierung im Western-Blot. Dieser Effekt war in allen onkogen mutierten Zelllinien nachvollziehbar und erreichte annähernd das Ausmaß der unbehandelten Wildtyp-Zellen.

Der Wildtyp-Klon RBW-1 verfügt im Gegensatz zu den mutierten Klonen über keine Hyperaktivierung des B-Raf nachgeschalteten Signalweges. In diesen Zellen kam es nach Behandlung mit den Inhibitoren zu keiner weiteren Inhibition des Signales. Vielmehr vermittelten die Western-Blot Analysen reproduzierbar den Eindruck einer verstärkten Phosphorylierung von Mek 1/2 und Erk 1/2. Um diesem subjektiven Eindruck nachzugehen, wurde eine densitometrische Quantifizierung durchgeführt.

Quantitative Auswertung

Die Signalintensitäten aus den Western-Blots wurden *in silico* densitometrisch ausgewertet. Die Signale für phosphoryliertes Zielprotein wurden auf die Intensitäten für Aktin und für unphosphoryliertes Protein normalisiert. Anschließend wurden alle Werte auf die jeweils zugehörige unbehandelte Probe standardisiert (Abbildung 42).

Für phospho-Mek 1/2 wurde dabei einerseits die in allen mutierten Zelllinien beobachtete Abschwächung des Signales bestätigt, die bei allen drei Inhibitor-Substanzen zwischen 90 % und 95 % betrug. Andererseits konnte die im Western-Blot nur schwach sichtbare, aber insgesamt deutlich vorhandene Verstärkung des phospho-Mek 1/2 Signals in RBW-1 nicht mehr nachvollzogen werden, sobald auf pan Mek 1/2 normalisiert wurde. Wie im Western-Blot erkennbar, war dieser Befund auf eine insgesamt in RBW-1 erhöhte Expression der Effektorkinase zurückzuführen.

Die Inhibition des Signalweges war auch auf Ebene von phospho-Erk-1/2 densitometrisch nachweisbar. Die zuvor für die Mek-Kinasen erhaltene Inhibition von 90 % bis 95 % war hier allerdings nur für GSK2118436 in allen *BRAF*-mutierten Zelllinien nachvollziehbar. Zudem konnte für Erk 1/2 in RBW-1 die erwartete Hochregulation der Phosphorylierung bestätigt werden, ohne dass der Effekt aufgrund einer verstärkten Expression nach Normalisierung mit pan-Erk 1/2 nivelliert wurde.

4.5 Verifikation des Phänotyps durch RNAi

Die im Knockout-Modell gefundenen B-Raf^{V600E}-abhängigen Phänotypen sollten in einem alternativen Modell bestätigt werden. Dazu sollte die Reduktion der heterozygoten Genotypen von RKO-E1 (*BRAF* wt/onc/onc) und RBOW (*BRAF* wt/onc/del) auf ein Wildtyp-Allel in RBW-1 simuliert werden. Nachdem keine gleichwertige genetische Methode zum *Somatic Cell Gene Targeting* existiert, wurde mit Hilfe von RNA-Interferenz versucht die Gesamtmenge der *BRAF*-Transkripte zu kontrollieren. Analog der im Vergleich zu Zellklonen mit V600E-Mutation starken Abnahme der B-Raf Kinaseaktivität in einer RBW-1 Zelle sollte durch RNAi die *BRAF*-Expression in den heterozygoten Zellklonen gesenkt werden. Dabei wurden sowohl siRNA-, als auch shRNA-Sequenzen verwendet, die *BRAF*-Transkripte unabhängig von deren Mutationsstatus erkennen und degradieren können.

4.5.1 *BRAF*-Knockdown durch siRNA

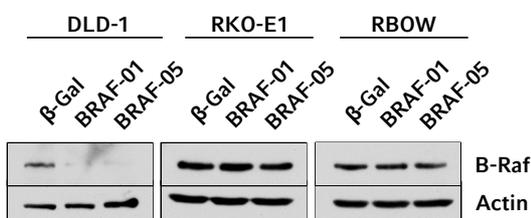


Abbildung 43: Regulation der *BRAF*-Expression durch siRNA. Mit Hilfe von siRNA wurde ein Knockdown der *BRAF*-Expression in DLD-1 erreicht. In den RKO-abgeleiteten Klonen wurde keine Veränderung der B-Raf Proteinlevel durch Transfektion mit siRNA erreicht.

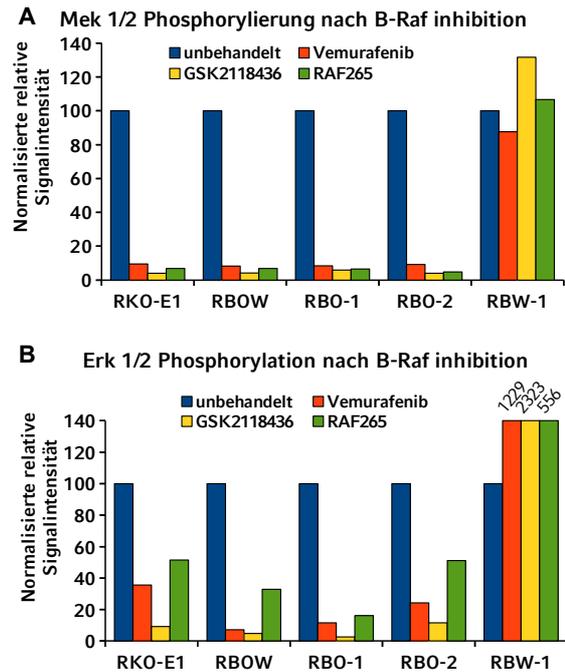


Abbildung 42: Densitometrische Quantifizierung der Mek/Erk-Signalwegsaktivität nach B-Raf Inhibition. Durch Densitometrie wurde der inhibierende Effekt der eingesetzten Substanzen für Mek 1/2 und Erk 1/2 bestätigt (siehe Abbildung 41). Zudem wurde in RBW-1 eine verstärkte Erk 1/2-Phosphorylierung nach Inkubation mit B-Raf Inhibitoren gemessen.

Mit Hilfe von zwei konfektionierten siRNA-Sequenzen sollte der Phänotyp des genetischen Knockouts in den parental Zelllinien RKO-E1 und RBOW nachvollzogen werden. Dazu wurden die Zellen nach der siRNA-Transfektion für 72 Stunden inkubiert und im Western-Blot analysiert. Eine siRNA-Sequenz gegen das β -Galaktosidase Transkript diente als Negativkontrolle zur Beurteilung der Spezifität. Als Kontrollzelllinie wurde die Transfektion parallel an DLD-1 Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizi-

enz wurde jeweils ein Zell-Aliquot mit einem Expressionsplasmid für das grün fluoreszierende Protein GFP kotransfiziert. Die Expression des Kontrollgens wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kontrolliert und konnte bei allen Proben in 70 % bis 80 % der Zellen nachgewiesen werden.

In den Lysaten aus DLD-1 war nahezu kein B-Raf Protein mehr nachweisbar. Die Reduktion der Expression war mit beiden verwendeten siRNA-Sequenzen gleich stark. Sowohl RKO-E1, als auch RBOW zeigten keine veränderte *BRAF*-Expression nach siRNA-Transfektion. Keine der getesteten Oligonukleotid-Sequenzen bewirkte eine Reduktion des B-Raf Signals im Vergleich zu Kontroll-siRNA (Abbildung 43).

4.5.2 Konditionaler Knockdown durch shRNA

Als alternative Strategie zur siRNA-Transfektion wurden die Zelllinien mit dem konditionalen shRNA-Konstrukt pTER/sh*BRAF* transfiziert. Nach der Selektion und Expansion stabiler Einzelklone wurde in sechs Kandidaten die shRNA-Transkription über 96 Stunden stimuliert.

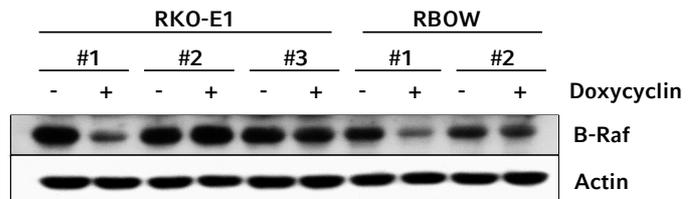


Abbildung 44: Regulation der BRAF-Expression durch shRNA. In den zwei stabil shRNA-transfizierten Klonen RKO-E1 #1 und RBOW #1 konnte nach Stimulation mit Doxycyclin eine Reduktion des B-Raf Proteinlevels und somit eine wirksame RNA-Interferenz beobachtet werden.

Die *BRAF*-Expression wurde im Western-Blot zwischen

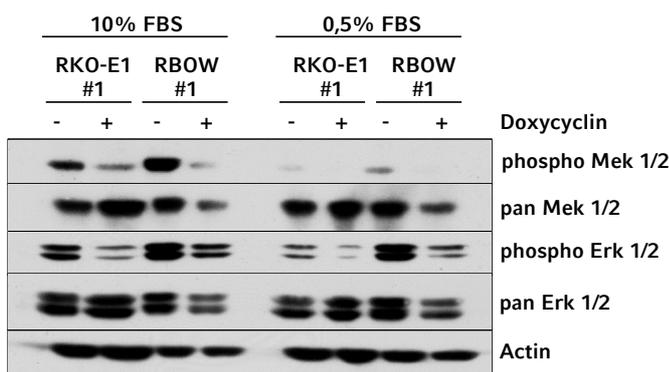


Abbildung 45: Verifikation der RNA-Interferenz im nachgeschalteten Signalweg. Die Doxycyclin-induzierte RNA-Interferenz in den Klonen RKO-E1 #1 und RBOW #1 wurde in Western-Blots für phospho-Mek 1/2 und phospho-Erk 1/2 unter verschiedenen Kulturbedingungen funktionell validiert.

stimulierten und unstimulierten Aliquots verglichen. Für die weiteren Experimente wurde nach Subklonen mit besonders deutlicher RNA-Interferenz gesucht. Sowohl aus RKO-E1, als auch aus RBOW wurde jeweils im ersten Einzelklon eine deutliche Abnahme der *BRAF*-Expression nachgewiesen. Diese zwei Klone wurden für die weiteren Experimente ausgewählt (Abbildung 44).

Zur funktionalen Verifikation der RNA-Interferenz wurde in den Lysaten der shRNA-transfizierten Klone die Phosphorylierung der Effektorproteine unterhalb von B-Raf untersucht. Unabhängig von den eingesetzten Serumkonzentrationen zeigte sich in beiden Zellklonen eine durchgehend reduzierte Aktivität der Signalkaskade in Doxycyclin-stimulierten Proben (Abbildung 45).

Anschließend wurde mit den zwei Subklonen RKO-E1 #1 und RBOW #1 in einer zeitlichen Auflösung der Effekt des *BRAF*-Knockdowns auf Erk 1/2

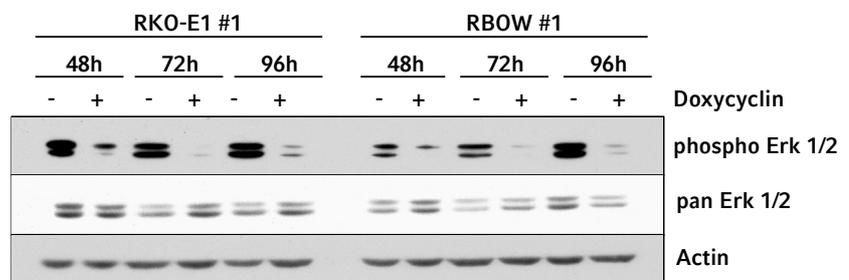


Abbildung 46: Zeitliche Stabilität der RNA-Interferenz. Die shRNA-vermittelte RNA-Interferenz war in beiden Klonen auf Ebene von phosphoryliertem Erk 1/2 im Zeitraum zwischen 48 Stunden und 96 Stunden nach Induktion stabil.

analysiert. Dazu wurden Zellaliquots 48, 72 und 96 Stunden nach Stimulation der shRNA-Transkription geerntet und lysiert. Im Western-Blot auf phospho-Erk 1/2 zeigte sich in beiden Klone über den gesamten Zeitraum eine deutliche Reduktion der Erk-Aktivierung (Abbildung 46).

4.5.3 Zellzyklus unter RNA-Interferenz

In den shRNA-transfizierten Klonen wurde der Effekt einer B-Raf vermittelten Reduktion des Mek-Erk-Signalings auf den Zellzyklus untersucht. Analog zu den doppelt deletierten Zellklonen wurden dabei Zellen unter Serummangel mit solchen aus Vollmedium verglichen.

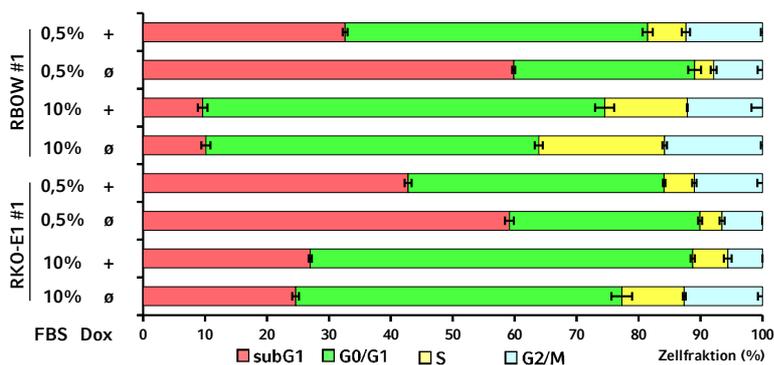


Abbildung 47: B-Raf Knockdown durch shRNA führt in RKO-E1 #1 und RBOW #1 zu verringerter Apoptose. Die Induktion von RNA-Interferenz führte in Standardmedium zu einer Reduktion der S- und G2/M-Phase. Nach Inkubation mit Hungermedium bewirkte die shRNA-Transkription eine deutliche Verkleinerung der sub G1-Fractionen.

Unter Standardbedingungen war in beiden Doxycyclin-stimulierten Proben ein Anstieg der G0/G1-Fraktion erkennbar. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Zellen in S- und G2/M-Phase. Nach Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium auf 0,5 % wurde das Verhältnis von ruhenden zu sich teilenden Zellen nicht mehr durch Doxycyclin beeinflusst (Abbildung 47).

Bedingt durch lange Inkubationszeiten zur Entfaltung der RNA-Interferenz wurden bei diesem Experiment hohe Apoptoseraten im Vergleich zu nicht-transfizierten Klonen beobachtet. Auf diesem relativ hohen Niveau war die apoptotische Zellfraktion im Standardmedium von der shRNA-Transkription unabhängig. Dagegen kam es unter Serummangel zu einer weiteren starken Erhöhung der basalen Apoptoserate, die nach Induktion des *BRAF*-Silencings deutlich abnahm.

4.6 B-Raf Tiermodelle

Zellkultur-basierte Knockout-Modelle gewährleisten eine homogene Zellpopulation und bieten damit sehr gute Möglichkeiten zur mechanistischen Aufklärung phänotypischer Befunde. Komplexe Folgeerscheinungen eines veränderten Genotyps zeigen sich jedoch oftmals erst in der heterogenen Mikroumgebung eines Tumors. Um auch B-Raf^{V600E}-abhängige Effekte hinsichtlich tumorbiologischer Phänotypen zu identifizieren und zu untersuchen, sollte das humane Onkogen im Mausmodell exprimiert werden. Hierzu wurden verschiedene experimentelle Ansätze parallel verfolgt.

4.6.1 Konditionaler Knockin im *ROSA26*-Genlocus

Ein Expressionsvektor für humanes B-Raf^{V600E} wurde basierend auf dem dem *Targeting*-Konstrukt pROSA26-PA kloniert und per Sequenzierung kontrolliert (siehe Kapitel 3.20.1). Das Plasmid wurde

linearisiert und durch Elektroporation in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht. Im nachfolgenden Selektionsschritt konnten keine resistenten Zellen gewonnen werden. Auch in mehreren Wiederholungen der Transfektion, in denen die Konzentration des eingesetzten G-418 Sulfats auf $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gesenkt wurde, überlebten keine transfizierten Zellen die Selektion.

4.6.2 Konditionaler Knockin im Aktin-Genlocus

In einer zweistufigen Klonierung und anschließenden Sequenzierung erfolgte die Herstellung des *Targeting*-Vektors zur Expression des humanen BRAF-Onkogens im murinen Aktin-Genlocus (siehe Kapitel 3.20.2). Embryonale Stammzellen wurden mit der linearisierten Plasmid-DNA transfiziert. Auch nach mehreren Transfektionsdurchgängen wurden keine resistenten Klone in den darauf folgenden Selektionen erhalten.

4.6.3 Transgenes Villin-Modell

Im transgenen *BRAF*-Tiermodell, in dem das Onkogen unter der Kontrolle des Villin-Promotors exprimiert werden sollte, wurde in den ersten Anpaarungen nur ein B-Raf^{T1799A}-exprimierendes Elterntier gefunden (Abbildung 48). Nachdem Versuche, weitere *Founder*-Tiere zu generieren, erfolglos blieben, wurde die Klonierung des Expressionskonstruktes wiederholt. Unter Verwendung von zwei unabhängigen Plasmidklonen wurden insgesamt 48 Kandidaten genotypisiert, ohne dass weitere *Founder*-Tiere gefunden wurden.

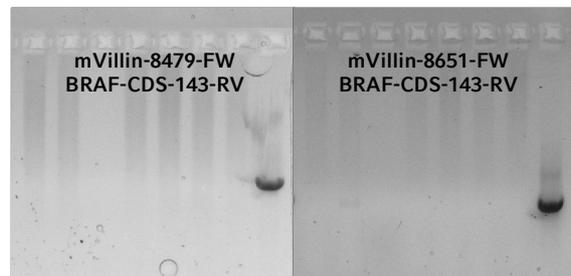


Abbildung 48: Genotypisierung im Villin-BRAF Mausmodell. Bei der Genotypisierung der Villin-BRAF *Founder*-Mäuse wurde mit zwei verschiedenen Primerpaaren ein Tier als positiv transgen identifiziert.

Bei dem gefundenen männlichen *Founder*-Kandidaten handelte es sich offenbar um ein chimäres Individuum, das die Transgenität nicht an seine Nachkommen vererbte. Zwar war die Villin-BRAF-Sequenz in genomischer DNA der Schwanzspitze während der gesamten Zuchtversuche nachweisbar. Dennoch wurde der Genotyp in mehreren Anpaarungen an keines der 27 getesteten F1-Tiere weitergegeben.

4.7 Alternatives Spleißen von *BRAF* in RKO

Durch einen Zufallsfund bei Klonierungsarbeiten konnte ein alternativ gespleißtes *BRAF*-Transkript in parental RKO-Zellen identifiziert werden. In der Folge wurde das alternative Spleißen der *BRAF*-mRNA systematisch untersucht.

In der mRNA von RKO wurde eine inzwischen beschriebene Spleißvariante des *BRAF*-Transkripts entdeckt, in deren Sequenz die Exons 14 und 15 fehlen⁸⁰. Durch die Deletion kommt es nachfolgend zu einer Verschiebung des Leserasters in der mRNA-Sequenz. Schließlich wird die Translation nach 28 Triplets

durch ein neues Stopcodon aus den Basen T¹⁹⁴⁶, G¹⁹⁴⁷ und A¹⁹⁴⁸ abgebrochen. Nachdem dieses Transkript in der Erstpublikation gerade in RKO nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Häufigkeit dieser Variante näher untersucht. Dabei wurden weitere alternative Transkripte mit bisher unbeschriebenen zusätzlichen Exons entdeckt (Abbildung 49).

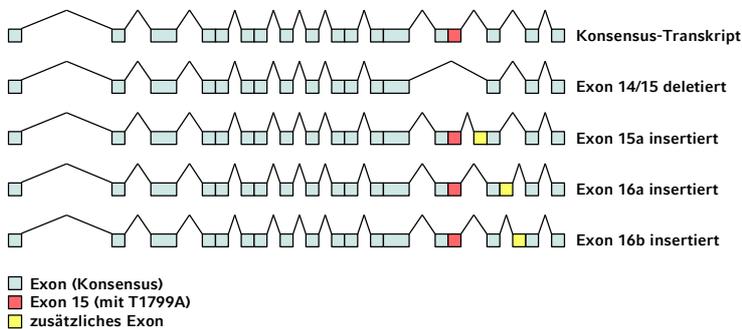


Abbildung 49: Schematische Darstellung der in RKO gefundenen BRAF-Transkripte. In der cDNA aus RKO wurden alternative BRAF-Transkripte gefunden. Entweder fehlen die Exons 14 und 15 in der mRNA oder es kommt zur Insertion eines zusätzlichen Exons vor oder hinter Exon 16.

Exon 15a ist eine 78 Basenpaare lange Sequenz, die in der genomischen Sequenz 2 339 Basenpaare hinter Exon 15 und 1 442 Basenpaare vor Exon 16 lokalisiert ist. Das Einfügen von Exon 15a in das BRAF-Transkript bewirkt einen Kettenabbruch durch ein TGA-Codon an Position 19 bis 21 in der zusätzlichen Sequenz.

Exon 16a und Exon 16b liegen 295 bzw. 1 839 Basenpaare hinter Exon 16 und umfassen 116 bzw. 82 Nukleotide. Im alternativ gespleißten Transkript mit Exon 16a ist aufgrund des verschobenen Leserasters das nächste aus der Originalsequenz gebildete Triplet (T¹⁹⁹⁴, A¹⁹⁹⁵, A¹⁹⁹⁶) ein Stopcodon und führt zum Abbruch der Translation. Im Fall von Exon 16b bewirken die zusätzlichen Nukleotide T³¹, G³² und A³³ einen vorzeitigen Kettenabbruch (Tabelle 5).

	CDS	Position	Kettenabbruch	Berechnete Masse
Wildtyp	2 301	-	Konsensus-TGA, 2299-2301	90,5 kDa
Mutiert	2 301	-	Konsensus-TGA, 2299-2301	90,5 kDa
Exon 14/15 Deletion	- 251	-	TGA 1946 - 1948, Exon 16	71,2 kDa
Exon 15a Insertion	+ 78	Exon 15 + 2 339	in Exon 15a (TGA 19 - 21)	74,8 kDa
Exon 16a Insertion	+ 116	Exon 16 + 295	TAA 1994 - 1996, Exon 17	83,7 kDa
Exon 16b Insertion	+ 82	Exon 16 + 1 839	in Exon 16b (TGA 31 - 33)	80,4 kDa

Tabelle 5: Übersicht und ausgewählte Daten zu B-Raf Isoformen in RKO. Angegeben sind die Konsequenzen des alternativen Spleißens auf die Länge der mRNA, ggf. die Position der zusätzlichen Exons in der genomischen Sequenz, sowie Position des Translations-Endpunktes und die berechnete molekulare Masse der jeweiligen Isoform.

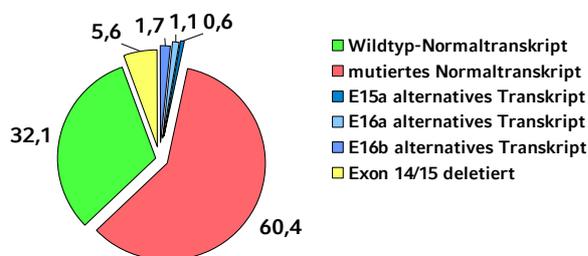


Abbildung 50: Häufigkeit der einzelnen Transkript-Varianten in RKO. Wildtyp- und mutierte Normaltranskripte stehen in einem Verhältnis von etwa 1 : 2. Die alternativ gespleißten Varianten machten zusammen etwa 9 % der BRAF-Transkripte in RKO aus.

Insgesamt wurden aus der mRNA von RKO 192 cDNA-Klone präpariert und sequenziert. Neben einigen Nonsense-Deletionen, die auf bakterielle Rekombinationen zurückgeführt wurden, konnten 179 Klone ausgewertet werden. Die im murinen *Braf*-Gen von alternativem Spleißens betroffene Region um Exon 9 war dabei in allen untersuchten Proben unauffällig. Demgegenüber trugen insgesamt sechs Klone eine Insertion jeweils eines der beschriebenen

alternativen Exons. In zehn Klonen wurde das an Exon 14 und Exon 15 deletierte Transkript gefunden (Abbildung 50).

Bei der Auswertung fiel auf, dass alle gefundenen Kopien, die eines der zusätzlichen Exons enthielten, ein Adenosin an Position 1799 enthielten und damit von einem der mutierten Allele stammten. Hieraus ergab sich die Vermutung, dass das *BRAF* Wildtyp-Allel in RKO nicht von alternativem Spleißen betroffen sein könnte. Um darüber eine verlässliche Aussage treffen zu können, sollten auch die deletierten Transkripte ihren ursprünglichen Allelen zugeordnet werden. Da sich die Mutationsstelle aber gerade in der deletierten Sequenz befindet, musste die Zuordnung indirekt vorgenommen werden. Dies gelang mit Hilfe der neu entdeckten A1928G-Mutation, die in allen Wildtyp-Kopien auftrat, in Transkripten mit T1799A-Mutation jedoch fehlte. Diese Mutation transformiert ein GGA-Triplet in GGG, die beide für Glycin kodieren, und hat daher keine Konsequenzen auf Proteinebene. Von den zehn deletierten Transkripten stammten sechs von den onkogen mutierten Allelen und vier vom verbliebenen Wildtyp-Allel.

4.7.1 Relative Allelaktivität

Mit Hilfe der A1928G-Substitution konnte schließlich auch das Gesamtverhältnis von mutierten zu Wildtyp-Transkripten, einschließlich aller alternativ gespleißten Kopien bestimmt werden. Den 136 dazu ausgewerteten Klonen lagen zu 33,6 % Wildtyp-Transkripte und zu 66,4 % Transkripte von einem der mutierten Allele zu Grunde. Demnach schien in den untersuchten RKO-Zellen kein Allel differenziell exprimiert zu werden.

4.7.2 Kinase-Aktivität der B-Raf Isoformen

Im Western-Blot wurden Lysate aus HEK293-Zellen eingesetzt, die zuvor mit Expressions-Plasmiden gegen verschiedene B-Raf Varianten transfiziert worden waren. Dabei diente eine Transfektion mit basalem pcDNA3-Plasmid (Leervektor) als Negativkontrolle und Zelllysat aus RKO-E1 als Positivkontrolle für ein aktiviertes B-Raf Signal.

Es zeigten sich generell erhöhte Mek 1/2- und Erk 1/2-Konzentrationen nach Expression der onkogen mutierten *BRAF*-Sequenz in HEK293-Zellen. Die Signale für phospho-Mek 1/2 und phospho-Erk 1/2 waren ebenfalls nach Transfektion mit pcDNA3/*BRAF*^{T1799A} am stärksten (Abbildung 51).

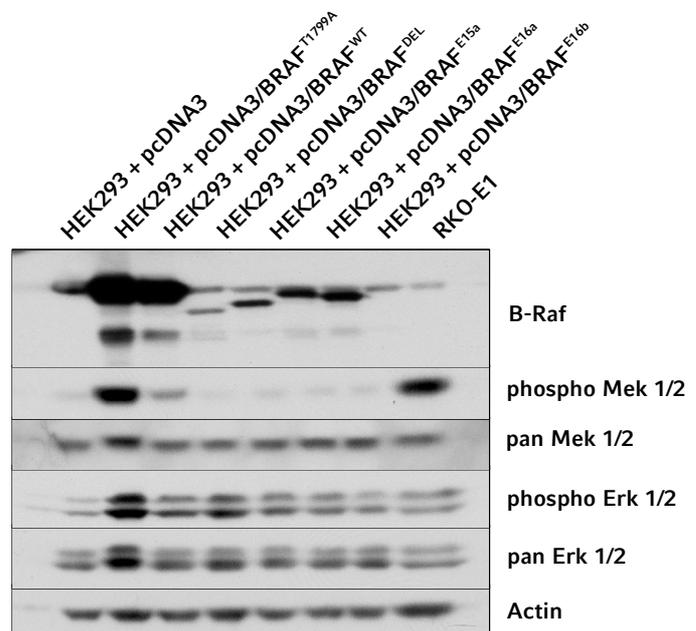


Abbildung 51: Western-Blot zur Analyse der alternativen B-Raf Isoformen. In HEK293 wurden die verschiedenen B-Raf Isoformen exprimiert und im Western-Blot nachgewiesen. Die verkürzten Isoformen des Proteins werden von dem eingesetzten Antikörper nur bedingt erkannt. Zudem wurde die Aktivität des B-Raf nachgeschalteten Signalweges analysiert. Für die auf Proteinebene verkürzten Isoformen wurde keine höhere B-Raf Aktivität als für die Leervektor-transfizierte Kontrolle beobachtet.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Western-Blot Signale für Aktin, B-Raf, pan Mek 1/2 und phospho-Mek 1/2 densitometrisch ausgewertet. Die Signalstärken für B-Raf, pan Mek 1/2 und phospho-Mek 1/2 wurden mit Hilfe der Aktin-Werte der jeweiligen Probe normalisiert. Die resultierenden Werte für *BRAF*-transfizierte HEK293-Zellen wurden an Hand der Werte der Negativkontrolle standardisiert (Abbildung 52).

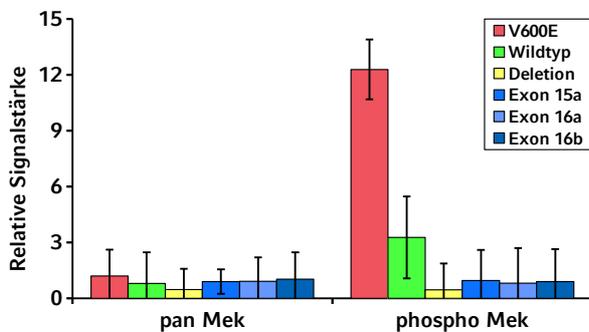


Abbildung 52: Densitometrische Bestimmung von Expression und Aktivität der B-Raf Isoformen. Die im Western-Blot erhaltenen Signalstärken für pan Mek 1/2 und phospho-Mek 1/2 wurden densitometrisch ausgewertet und auf Aktin normalisiert (siehe Abbildung 53). Die V600E-Mutante zeigte die stärkste Mek 1/2-Phosphorylierung. Wildtyp B-Raf aktivierte das Substrat stärker als die alternativ gespleißten Isoformen.

Die so ermittelten Daten zeigen eine vergleichsweise schwache Expression der *BRAF*-CDS in HEK293, die mit dem onkogen mutierten Konstrukt transfiziert wurden. Daneben ist die Phosphorylierung für Mek 1/2 in diesen Zellen besonders hoch.

Die Transfektion mit Wildtyp-BRAF verursacht eine im Vergleich zu B-Raf^{V600E}-produzierenden Zellen weitaus schwächere relative Mek-Phosphorylierung. Die Werte der Spleiß-Varianten sind untereinander ähnlich, erreichen etwa das 0,9-Fache der Leervektor-transfizierten Zellen und bleiben damit nochmals deutlich unter den Werten für das Wildtyp-Protein.

4.8 E-Cadherin im Darm

Strukturproteine wie E-Cadherin vermitteln Zellkontakte und spielen neben anderen epithelialen Gewebetypen auch im Darmepithel eine entscheidende Rolle. In Villin-Cre-ER^{T2}; *Cdh1*^{fl/fl}-Mäusen wurde der Einfluss von E-Cadherin auf die intestinale Homöostase und auf die Barriere gegen bakterielle Invasion untersucht. Nach der Initiation des Knockouts durch Rekombination zeigten die Mäuse zelluläre Erosionen an den Spitzen der Villi im Dünndarm und eine weitgehende Auflösung der Gewebearchitektur im Kolon. Die Tiere wiesen einen verschlechterten Allgemeinzustand auf, erlitten blutige Durchfälle und verstarben bei weiterhin intensiver Gabe von Tamoxifen. Bei sanfteren Rekombinationsprotokollen differierten die Verumtiere zunehmend im Körpergewicht von der Kontrollgruppe. Sie zeigten Abweichungen in der Darmlänge und in der Gesamtmasse des Darmgewebes¹²⁸.

4.8.1 Panethzellen

In Tamoxifen-behandelten Versuchstieren war die Ausbildung von Panethschen Zellen im Dünndarm stark beeinträchtigt. Die mikroskopische Quantifizierung ergab im Durchschnitt etwa eine Halbierung ihrer Anzahl. Dabei waren häufig weniger als drei Panethzellen im Anschnitt einer Krypte nachzuweisen (Abbildung 53 A-C).

Plaques homogenisiert, in PBS suspendiert und ebenfalls auf Agarplatten inkubiert. Der Unterschied zwischen E-Cadherin defizienten Tieren und der Kontrollgruppe war sowohl für Darmgewebe, als auch für Peyer-Plaques statistisch signifikant mit $p < 0,05$.

4.8.3 Chronische Auswirkungen

Die Auswirkungen einer chronischen E-Cadherin-Defizienz wurde in einem moderaten Injektionsprotokoll untersucht. Während der mehrmonatigen Versuchsdauer kam es an zwei Zeitpunkten zu unkontrollierten Abweichungen von den standardisierten Haltungsbedingungen. Bereits in der ersten Woche nach Beginn der Tamoxifen-Injektionen kam es in der Tierhaltung zu einer Infektion mit Trichomonaden. Nach der Behandlung mit Metronidazol im Trinkwasser waren keine Parasiten mehr nachweisbar. Während sich Infektion und Behandlung nicht auf das durchschnittliche Körpergewicht der Kontrolltiere auswirkte, war eine drastische Gewichtsabnahme der Verumgruppe an Tag 8 zu beobachten. Während einer Wirkstoffapplikation über das Trinkwasser nehmen Mäuse aufgrund des bitteren Geschmacks häufig weniger Wasser auf. Während die Kontrolltiere dadurch keine offensichtlichen physiologischen Beeinträchtigungen erlitten, schienen die rekombinierten Tiere in diesem Zeitraum deutlich mehr Wasser auszuscheiden, als sie aufnahmen.

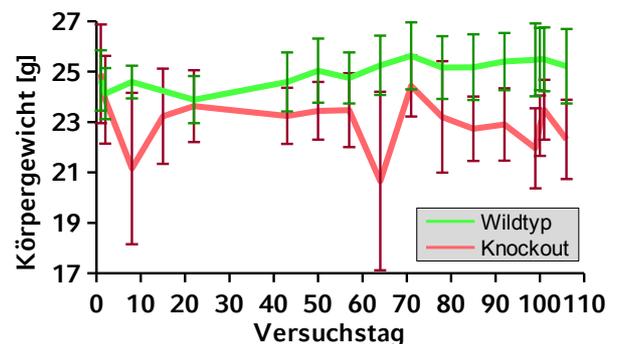


Abbildung 55: Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts in Kontroll- und Verumgruppe. Während des Langzeit-Versuches zum *Cdh1*-Knockout kam es kurz nach Versuchsbeginn zu einer Infektion mit Trichomonaden. Knockout-Tiere reagierten mit einem deutlichen Gewichtsverlust auf die Infektion.

Im Weiteren kam es etwa neun Wochen nach Injektionsbeginn durch einen Pflegefehler zur Mangelversorgung mit Wasser und in der Folge zu einer erneuten Gewichtsabnahme an Tag 64 bei zwei Verumtieren (Abbildung 55).

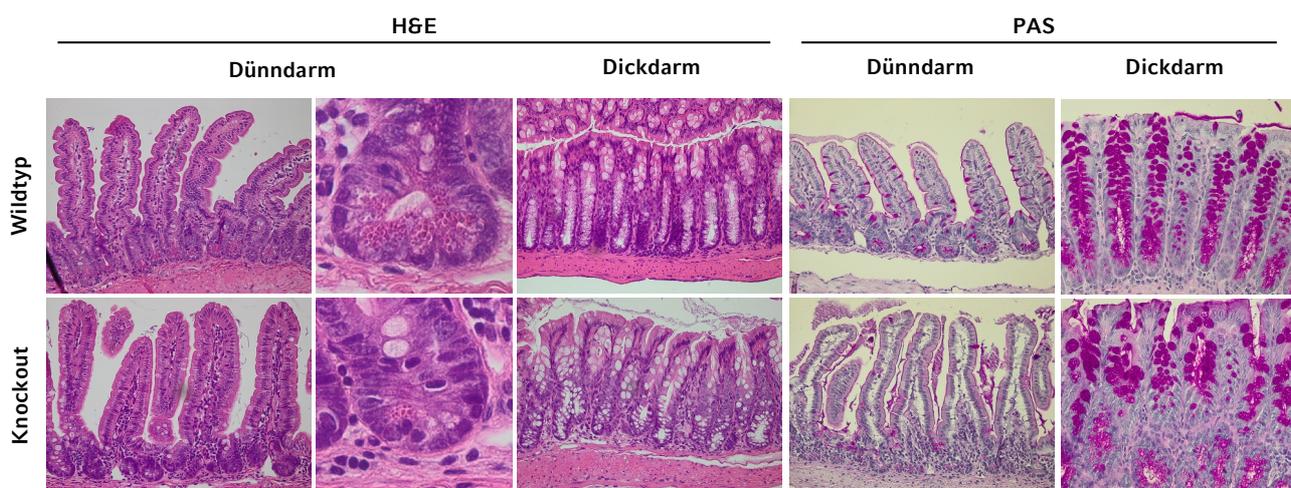


Abbildung 56: Histologischer Phänotyp des *Cdh1*-Knockouts in Dün- und Dickdarm im chronischen Modell. Der Phänotyp verminderter Paneth-Zellen und kleiner Granula konnte in einer H&E-Färbung nachvollzogen werden (erste und zweite Spalte). Der Aufbau des Darmgewebes wurde durch die Rekombination nicht wesentlich beeinflusst (Spalte 1 bis Spalte 3). Sowohl in Dün-, als auch im Dickdarm traten veränderte Muster PAS-positiver Zellen auf (Spalte 4 und Spalte 5).

Histologisch konnte der Phänotyp des aggressiveren Tamoxifen-Protokolls größtenteils nachvollzogen werden. Die Reifung von sezernierenden Zellen in Dünndarm und Dickdarm war beeinträchtigt, entsprechend der geänderten Versuchsbedingungen jedoch weniger stark als bei intensiver Rekombination. Auch die Defekte in der Ausbildung von Panethschen Zellen und deren Granula waren im chronischen Versuch nach Knockout des *Cdh1*-Gens zu beobachten (Abbildung 56).

Trotz der nicht pathogenfreien Haltung der Tiere und einem Befall mit Darmparasiten zeigte die histologische Auswertung keine Anzeichen einer Colitis. Weder im Dünndarm noch im Kolon konnte der mit der Auswertung betreute Pathologe inflammatorische Herde ausmachen oder ein differenzielles Muster im Auftreten von Immunzellen feststellen. Bis auf die beschriebenen Veränderungen der Zelldifferenzierung waren die Darmschnitte beider Versuchsgruppen histologisch unauffällig.

5 Diskussion

5.1 B-Raf^{V600E}-Knockout in RKO

5.1.1 Auswahl eines biologischen Modellsystems

Das Verständnis der kolorektalen Karzinogenese und die Möglichkeiten einer individualisierten Therapie haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Dank der Identifikation molekularer Marker können Darmkrebs-Patienten in Untergruppen eingeteilt und spezifisch behandelt werden. Andererseits ist durch die Kombination mehrerer dieser Marker klar geworden, dass für einige Tumortypen kaum therapeutische Strategien bestehen. Insbesondere hinsichtlich moderner zielgerichteter Wirkstoffe besteht für die betroffenen Patienten ein großer Bedarf an neuen Therapie-Konzepten.

Einen besonderen therapeutischen Fortschritt stellt die Antikörper-basierte Inhibition des Wachstumsrezeptors EGFR dar. Jedoch wurde bereits in frühen Untersuchungen gezeigt, dass Mutationen der nachgeschalteten Kinasen K-Ras und B-Raf Resistenz gegen EGFR-Antikörper vermitteln können. Für betroffene Patienten wurden kombinierte Therapieschemata aus EGFR-Inhibition und zusätzlicher Raf-Inhibition durch Sorafenib untersucht⁶². Parallel dazu wird für diese Subpopulation ein therapeutischer Nutzen von aktuellen B-Raf Inhibitoren erwartet, die zunächst zur Melanom-Therapie zugelassen sind oder werden.

Während sich Mutationen in K-Ras und B-Raf gegenseitig ausschließen^{129 130}, tritt in beiden Fällen oft eine zusätzliche Mutation im *PIK3CA*-Gen auf, das für eine Untereinheit der PI3-Kinase kodiert^{131 132}. Für den B-Raf Inhibitor Vemurafenib ist bereits bekannt, dass die Mutation der PI3-Kinase und die Hyperaktivierung des alternativen Armes des MAPK-Signalweges eine Behandlung mit Inhibitoren der Mitogen-aktivierten Kaskade vereitelt.

Ziel war es, für die Subgruppe derjenigen Darmkrebs-Patienten, die eine Mutation sowohl in B-Raf, als auch in der PI3-Kinase aufweisen, ein geeignetes Modellsystem zur *in vitro*-Untersuchung zu finden. Die Wahl fiel dabei auf die Zelllinie RKO, da diese in der Kombination ihrer molekularen Marker besonders gut den Subtyp des kolorektalen Karzinoms repräsentiert, der über die Zwischenstufe des serratierten Adenoms entsteht (siehe Abbildung 6). Neben den Mutationen in *BRAF* und *PIK3CA* zeigt RKO eine hohe Mikrosatelliten-Instabilität und weist den Phänotyp methylierter CpG-Inseln auf. Für andere entscheidende molekulare Marker, im Einzelnen *KRAS*, *APC*, *TP53* und chromosomale Instabilität, ist RKO negativ. Durch die hohe Übereinstimmung mit den Merkmalen eines spezifischen Subtyps sollten experimentelle Daten aus RKO auf eine möglichst große und gut definierte Gruppe von Patienten übertragbar sein.

5.1.2 Auswahl der Methode zur Erzeugung eines Knockouts

Knockout-Modelle gewährleisten eine größtmögliche Korrelation von veränderten Genotypen mit den beobachteten phänotypischen Konsequenzen. Im Gegensatz zu alternativen Methoden wie RNA-Interferenz

oder Transfektion ist der durch die Manipulation des Erbgutes erzielte Effekt quantitativ, physiologisch und endogen. Die Gefahr experimenteller Artefakte ist im Knockout-Modell sehr klein.

Während für tumorbiologische Fragestellungen in der Regel auf Tiermodelle zurückgegriffen wird, lassen sich die molekularen und therapeutischen Auswirkungen humaner Onkogene nicht zuverlässig in anderen Spezies untersuchen. Oftmals weichen die im Tierversuch erzielten Effekte in entscheidenden Details von der pathophysiologischen Situation beim Menschen ab. So entwickeln beispielsweise APC^{min/+}-Mäuse zahlreiche Tumoren im Dünndarm, während bei Darmkrebspatienten mit vergleichbarer Schädigung das Kolon betroffen ist. Demnach ist die Arbeit mit menschlichen Zellen eine Voraussetzung, um die Ergebnisse aus der Untersuchung einzelner Signalwege und dort wirksamer Inhibitoren auf die klinische Situation übertragen zu können.

Vor diesem Hintergrund sollten die Auswirkungen der B-Raf^{V600E}-Mutation in einem Knockout-Modell an menschlichen Zellen untersucht werden. Die hierzu bestehenden methodischen Alternativen sind begrenzt. Neben dem *Somatic Cell Gene Targeting* steht das CompoZr ZFN-System als kommerzielles Angebot zur Verfügung, bei dem genetische Sequenzen gezielt durch spezifische Zinkfinger-Nukleasen ausgeschaltet werden. Dabei kann zwischen zwei prinzipiell verschiedenen Arten der Anwendung gewählt werden, in denen es entweder zur Deletion eines beliebigen Zielgens kommt, oder zur Insertion beliebiger Sequenzen in einen vorgegebenen Genlocus.

Im ersten Fall werden zwei CompoZr-Nukleasen mit jeweils einer Zielgen-spezifischen Erkennungssequenz ausgestattet. Zur Induktion eines Doppelstrangbruchs muss die eine Erkennungssequenz im Sinnstrang 5'-terminal (*upstream*) zur Restriktionsstelle gelegen sein und die andere 5'-terminal im komplementären Strang. Der Doppelstrangbruch wird von der Zelle anschließend mit Hilfe einer kurzen Template-Sequenz repariert. Die Zinkfinger-Proteine werden in Form ihrer mRNA durch transiente Transfektion in die Zelle eingebracht und dabei im Überschuss eingesetzt. Bedingt durch dieses Prinzip sind in der Regel beide Allele eines Gens vom Knockout betroffen, sodass sich keine korrespondierenden Subklone mit Wildtyp- oder mutierten Allelen herstellen lassen. Zur Untersuchung einer monoallelischen *BRAF*-Mutation im Vergleich zur nicht mutierten Zelle ist diese Methode daher ungeeignet.

Bei der alternativen Anwendung dieses Systems werden Knockin-Sequenzen (z.B. Selektionsmarker) in ein *Targeting*-Konstrukt inkloniert, das homologe Sequenzen für die Hybridisierung im *AAVS1*-Genlocus (*Adeno-associated Virus Site 1*) enthält. Nach Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Zinkfinger-Nukleasen wird dieses Konstrukt zur Reparatur des Doppelstrangbruchs verwendet und die inklonierten Sequenzen in das Genom der Zielzelle integriert. Um diesen Ansatz auf einen beliebigen Genlocus zu übertragen, müssten einerseits mRNAs für Zielgen-spezifische Zinkfinger-Proteine an Stelle der standardisierten Sequenzen eingesetzt werden. Andererseits müsste ein neues *Targeting*-Plasmid hergestellt und die homologen Sequenzen an den neuen Genlocus angepasst werden. Damit unterscheidet sich dieser Ansatz im erforderlichen Aufwand nicht mehr vom *Somatic Cell Gene Targeting*, ist dabei aber aufgrund der hohen Kosten für die nötigen mRNA-Oligonukleotide aus ökonomischer Sicht weniger attraktiv.

5.1.3 Besondere Herausforderungen beim *Somatic Cell Gene Targeting*

Obwohl beim *Somatic Cell Gene Targeting* überwiegend etablierte Methoden angewendet werden, kann für einige experimentelle Schritte nicht auf Standard-Protokolle zurückgegriffen werden.

Bereits bei der Fusions-PCR zur Herstellung der *Targeting*-Konstrukte musste von der ansonsten üblichen Vorgehensweise abgewichen werden, die im Reaktionsansatz verbliebene Template-DNA vom Produkt zu trennen. Aufgrund vergleichbarer Fragmentlängen war eine Reinigung des PCR-Produktes im Agarosegel grundsätzlich nicht möglich. Bei der Betrachtung des weiteren Klonierungs-Protokolls wird klar, dass diese Edukt-Kontamination in mehrfacher Hinsicht kompensiert wird.

- Da die Template-Kopien keine geeigneten Restriktionsstellen aufwiesen, konnte eine spätere Ligation mit dem pAAV-Plasmid weitgehend ausgeschlossen werden.
- Zudem hätte eine Rezyklisierung der Template-Sequenzen zwar in den transformierten Bakterien zur Vermittlung einer G418- oder Hygromycin-Resistenz geführt. Doch durch die Doppelselektion mit Zeocin, dessen Resistenzgen auf dem pAAV-Fragment lokalisiert war, konnte auch dieser Umstand ignoriert werden.
- Schließlich konnte im Rahmen der Etablierung der Fusions-PCRs gezeigt werden, dass die Template-DNA am Ende der Temperaturzyklen weitgehend hydrolysiert wurde. Im Agarosegel war nach den 22 verwendeten Zyklen keine Template-Bande mehr nachweisbar (ohne Abbildung).

Darüber hinaus wurde ein hoher Aufwand zur Vermeidung von Punktmutationen in den *Targeting*-Konstrukten betrieben. Der Grund dafür liegt vornehmlich in der Länge der Sequenzen, die in der Fusions-PCR amplifiziert werden müssen. Dadurch, dass die sogenannten *Megaprimer*, also die Homologiearme einschließlich der Linker-Sequenzen, bereits durch PCR hergestellt wurden, kommt es für diese Sequenzen zu einer hohen Gesamtanzahl an PCR-Zyklen. Um die Mutationswahrscheinlichkeit zu minimieren wurde einerseits das Protokoll auf so wenig Zyklen wie möglich optimiert und eine Polymerase mit bestmöglicher Fehlerkorrektur eingesetzt. Andererseits wurde nach der Ligation die gesamte Mischpopulation weitergeführt, um den Anteil intakter AAV-Individuen statistisch zu maximieren. Hierbei wurde angenommen, dass in den Homologie-Regionen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit einzelne Mutationen aufgetreten sind, die jedoch in der Mehrzahl der Kopien die Rekombination zwischen viraler und genomischer DNA nicht entscheidend beeinträchtigen. Durch die Verwendung der Mischpopulation wird folglich ein hoher Anteil an Klonen ohne Mutationen in funktionellen Motiven gewährleistet. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Klonierungen zu keinem Zeitpunkt ein Einzelklon isoliert.

Nicht nur die vielfach amplifizierten Homologiearme, sondern auch die dazwischen liegenden Sequenzen können von fehlerhaften Nukleotid-Inkorporationen betroffen sein. Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation innerhalb der loxP-Sequenzen oder der Resistenzgene der Template-DNA wurde berechnet und mit den Herstellerangaben verglichen. Zur Berechnung wurde der Wirkungsgrad eines PCR-Zyklus auf 90 % geschätzt und die Polymerase-spezifische Fehlerrate des Herstellers in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zyklenzahl} \cdot \text{Wirkungsgrad} \cdot \text{Fehlerrate} \cdot \text{Fragmentlänge} = \text{Fehler} \cdot \text{Kopie}^{-1}$$

Für die etwa 2 000 Basenpaare der Neo-Kassette wurde ein Wert von 1,74 (Herstellerangabe: 1,94) und für die Hyg-Resistenz mit 2 500 Basenpaaren 2,18 (Herstellerangabe: 2,42) errechnet. Vor dem Hintergrund dieser Werte und angesichts der polyklonalen Population wurde das Auftreten von Fehlern mit Auswirkungen auf die funktionellen Sequenzen der Fusions-PCR-Produkte vernachlässigt.

Im Weiteren wurde vor der Herstellung der Zellklone auf eine Titerbestimmung der AAV-Lysate, wie sie in anderen Protokollen üblich ist, verzichtet. Die genaue Kenntnis der Viruslast nach standardisierten Methoden hätte an dieser Stelle eine zellspezifische Titration der Virus-Suspension an RKO-E1 nicht ersetzt. Stattdessen wurde durch das erste Infektionsexperiment einerseits das optimale Verhältnis von AAV-Lysat zur Zellzahl ermittelt. Andererseits konnten nach der Selektion bereits erste Knockout-Kandidaten aufgezogen und analysiert werden.

5.1.4 Effizienz des Knockouts

Mit über 1 000 CFU aus einer 10 cm Zellkulturschale bei 0,2 mL AAV-Suspension waren die hergestellten Lysate in hohem Maße infektiös. Aufgrund dieser sehr guten Ausbeute an Kolonien konnten die Selektionsbedingungen relativ stringent gewählt werden. Die für die Selektionen eingesetzten Dosen von $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ G418-Sulfat und $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hygromycin B entsprachen etwa dem Zweieinhalb-fachen der letalen Dosis nicht resistenter Zellen.

Die eigentliche Effizienz im *Somatic Cell Gene Targeting* hängt nicht von der Ausbeute an resistenten Klonen ab, die durch einen Mehreinsatz von Material kompensiert werden könnte. Wesentlich kritischer ist das Verhältnis von korrekt rekombinierten Knockout-Klonen zu solchen Klonen, bei denen die virale DNA (einschließlich Resistenzgen) an zufälliger Stelle in Genom integriert wurde. Diese Ratio ist im Wesentlichen von der Zugänglichkeit der Zielsequenz innerhalb der Chromatinstruktur und von der generellen Suszeptibilität der verwendeten Zelllinie für das AAV-*Targeting*-System abhängig. Während sich die Erreichbarkeit des Genlokus nicht ohne Weiteres *a priori* bestimmen lässt, liegen für verschiedene Zelltypen bereits Erfahrungen vor. Dabei fallen einzelne Zelllinien regelmäßig durch eine besonders hohe Effizienz auf. So werden beispielsweise beim *Targeting* in PL5-Zellen Werte von deutlich unter 1 : 100 für das Verhältnis von positiven Klonen zur Gesamtzahl resistenter Klone erhalten. Dagegen weisen RKO-Zellen erfahrungsgemäß Werte im Bereich von 1 : 400 bis 1 : 800 auf und gehören damit zu den Zelltypen mit relativ schlechter AAV-Kompatibilität¹¹⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich dazu eine nochmals deutlich niedrigere Effizienz erhalten. Die beim *Targeting* des ersten Allels erreichte Ratio von einem etablierten Zellklon in ca. 3 600 resistenten Kolonien ist dabei allerdings als nicht repräsentativ anzusehen. Grund dafür ist, dass für die Etablierung der *Screening*-PCR Prinzipbedingt keine Positivkontrollen verfügbar waren. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einem festen Probensatz hätte eine arbeitsaufwändige Expansion und Passagierung der Klone über das 96-well Format hinaus erfordert. Stattdessen wurden in kurzen zeitlichen Abständen neue Klone generiert, an denen weitere Temperaturprotokolle getestet werden konnten. Dadurch kam es im ersten Knockout-Durchgang zu einer Erhöhung der Anzahl erstellter Klone¹⁰⁵. Nach der

Identifikation dieses ersten Knockout-positiven Klons durch beide *Screening*-PCRs wurden die PCR-Bedingungen für die weiteren Knockout-Ansätze beibehalten.

Einen verlässlichen Wert für die Effizienz des *BRAF-Targetings* in RKO-derivierten Zellen stellt daher das im Knockout des zweiten Allels beobachtete Verhältnis von etwa 1 : 1 400 dar. Auch dieser Wert ist deutlich unterhalb der für RKO erwarteten Effizienz und spricht für eine komplexe und unzugängliche Chromatinstruktur am anvisierten Genlokus.

5.1.5 Selektion gegen Wildtyp-Klone und *Oncogene Addiction*

Im Rahmen der Infektion von RBOW gab es bedingt durch die Aneuploidie der Zellen drei Möglichkeiten einer erfolgreichen Rekombination. Eine erneute Integration der viralen DNA im bereits deletierten Allel wurde aufgrund der Doppelselektion mit G418-Sulfat und Hygromycin B jedoch in keinem Fall beobachtet. In den sieben identifizierten Knockout-Klonen lag das Verhältnis der Genotypen *BRAF*^{wt/del/del} und *BRAF*^{onc/del/del} bei 1 : 6. Um zu überprüfen, ob diese Ratio durch unterschiedlich schnelle Koloniebildung hervorgerufen wurde, wurden besonders langsam wachsende Klone jeder Infektions-Charge gesondert analysiert. Wildtyp-Klone, die initial langsamer proliferierten, wären in diesem zeitlich versetzten Screening entdeckt worden. Unter den schwach proliferierenden Kandidaten konnten jedoch keine weiteren Knockout-positiven Klone identifiziert werden. Dieser Befund steht im Einklang mit den Daten zur Serum-abhängigen Proliferation, nach denen RBW-1 Zellen unter guter Versorgung mit FBS nicht wesentlich langsamer proliferieren als Klone mit Mutation. Somit konnte eine Fehleinschätzung des Verhältnisses zwischen Wildtyp- und V600E-Klonen aufgrund einer verzögerten Koloniebildung ausgeschlossen werden.

Vor dem Hintergrund der schlechten Effizienz des *BRAF*-Knockouts in den RKO-Derivaten und wegen der anzunehmenden Selektion gegen Wildtyp-Klone im sekundären *Targeting* wurde von der Generierung eines weiteren RBW-Klons abgesehen. Da sich die korrespondierenden Zellen im *Somatic Cell Gene Targeting* auf genetischer Ebene nur in einem Allel unterscheiden, sind klonale Effekte theoretisch sehr unwahrscheinlich. Zudem konnte die Wahrscheinlichkeit klonaler Abweichungen zwischen RBW-1 und den RBO-Zellklonen weiter gesenkt werden, indem die RBOW-Zellpopulation vor der Deletion des zweiten Allels nur wenige Male passagiert wurde. Dadurch wurde für die Induktion des zweiten genetischen Ereignisses eine in hohem Maße homogene Zellpopulation verwendet. Der große Aufwand zur Herstellung eines weiteren Wildtyp-Klons in Relation zu dem methodisch bedingt geringem Gewinn an Evidenz wurde daher als unangemessen erachtet. Die folgende phänotypische und pharmakogenetische Charakterisierung wurde demzufolge mit einem einzelnen RBW-Klon durchgeführt.

Die deutliche Überzahl der Klone mit Mutation legt eine Abhängigkeit der Zellen vom Onkogen (*Oncogene Addiction*) nahe^{133 29}. Ein weiterer Beleg für eine *Oncogene Addiction* ist der trotz positiver Transfektionskontrolle durch GFP fehlgeschlagene Versuch, die *BRAF*-Expression in der Versuchszellen durch siRNA zu inhibieren. Während die konstitutive RNA-Interferenz in der Vergleichszelllinie DLD-1 gelang, musste für die RKO-Klone eine induzierbares shRNA-Setup gewählt werden. Diese Interpretation wird durch die

Beobachtung weiter gestützt, dass sich die S- und G2/M-Populationen der shRNA-Klone nach Doxycyclin-Zugabe im Vollmedium verringerten.

Die gewonnenen Knockout-Zellen RBO-1 und RBO-2 einerseits, sowie RBW-1 andererseits, dienten zum Vergleich von V600E- und Wildtyp-Phänotypen in korrespondierenden Zellklonen. Hierzu wurde im Western-Blot eine vergleichbare Expression der verbliebenen *BRAF*-Allele in allen Zellklonen nachgewiesen. Durch den Nachweis einer in RBW-1 reduzierten Phosphorylierung der nachgeschalteten Effektor-kinasen Mek 1/2 und Erk 1/2 wurde der Knockout auf funktioneller Ebene validiert. Zudem wurde weder in onkogen mutierten Zellen, noch in RBW-1 die Phosphorylierung durch Serumentzug im Vergleich zum Standardmedium reduziert. Somit wurde gezeigt, dass auch unter Hungerbedingungen die Beeinträchtigung der B-Raf Signalaktivität in RBW-1 stabil blieb und nicht durch *Crosstalk* nach Aktivierung alternativer Signalwege beeinflusst wurde. Dieser Mangel an redundanten Systemen zur Kompensation des abfallenden B-Raf Signals deutet ebenfalls auf das Vorliegen einer *Oncogene Addiction* hin.

RKO-Zellen sind demnach unter entsprechendem Selektionsdruck auf die Expression von *BRAF* angewiesen. Ein solches Onkogen wird auch als Achillesferse einer Krebszelle bezeichnet und stellt ein optimales molekulares Ziel für therapeutische Strategien dar. Eine ähnliche Abhängigkeit von B-Raf^{V600E} wurde für Melanomzellen mit Hilfe von RNA-Interferenz^{134 135} und Inhibitoren gegen Mek 1/2¹³⁶ und B-Raf^{f137 138} gezeigt. Nicht zuletzt auf der Basis dieser Daten wurde die Zulassung der Vemurafenib-Therapie zur Behandlung von Melanomen vorangetrieben. Vor dem Hintergrund einer ähnlich starken *Oncogene Addiction* in RKO ist eine starke Rationale für *BRAF*-Screenings in der klinischen Routine nach der Diagnose kolorektaler Karzinome gegeben. Analog zu den großen Erfolgen beim Melanom, könnten im Rahmen einer solchen Selektion B-Raf^{V600E} positive Darmkrebs-Patienten von einer zielgerichteten Therapie gegen B-Raf in besonders hohem Maße profitieren.

5.2 Zellbiologische Phänotypen

5.2.1 Selbstversorgung mit Wachstumssignalen

Im täglichen Umgang mit den Zellen sind weder morphologische Unterschiede, noch differenzielle Proliferationsraten zwischen den Zelllinien aufgefallen. Dieser subjektive Eindruck wurde im Proliferationsassay mit 10 % Serumanteil bestätigt. In RBW-1 wird das schwächere B-Raf *Signaling* offenbar durch eine optimale Versorgung der Zellen mit Serum ausgeglichen. Andererseits wurde im Western-Blot nachgewiesen, dass auch mit 10 % FBS reduzierte Konzentrationen an phospho-Mek 1/2 und phospho-Erk 1/2 in RBW-1 vorliegen. Daher ist anzunehmen, dass in den Wildtyp-Zellen das EGFR-*Signaling* durch die Transduktion externer Wachstums-Signale über andere Signalwege kompensiert werden kann.

Die Annahme einer solchen Kompensation wurde schließlich durch Messung der Proliferation bei niedrigeren Serum-Konzentrationen bestätigt. Sobald den Zellen die externen Faktoren entzogen wurden,

verlangsamte sich mit sinkender Serumdosis das Wachstum von RBW-1 im Vergleich zu den Klonen mit V600E-Mutation. Die Phosphorylierungs-Muster der Zellklone für Mek 1/2 und Erk 1/2 blieben zwischen den unterschiedlichen Kulturbedingungen jedoch gleich. Dies bestärkt die Annahme, dass die Proliferation in RKO weitgehend unabhängig vom Erk 1/2-Signal ist, so lange eine gute Versorgung mit Signalen und Nährstoffen gegeben ist. Erst bei schlechter Versorgungslage, wie sie häufig im Tumor anzutreffen ist, spielt die Hyperaktivierung der Mitogen-aktivierten Signalkaskade eine entscheidende Rolle. Als ein möglicher Kandidat für eine unter Standardbedingungen redundante Signalkaskade ist der PI3K/Akt-Signalweg in der Literatur beschrieben¹³⁹. Besonders im Hinblick auf das parallel zu *BRAF* mutierte *PIK3CA*-Gen kommt auch in den RKO-abgeleiteten Zellen für die weitgehende Kompensation des Ras/Raf/Mek/Erk-Signals die PI3K/Akt-Kaskade in Frage.

Die proliferativen Unterschiede der Zellklone und insbesondere die Sensitivität der Wildtyp-Zellen auf Serummangel konnten auch anhand der Zellzyklus-Verteilungen nachvollzogen werden. In der Durchflusszytometrie wurden nach Inkubation mit 10 % FBS für alle Zellklone ähnliche Histogramme erhalten. Die vergleichsweise großen G2/M-Populationen der Zellklone wurden dadurch hervorgerufen, dass die parentale Zelllinie RKO im Vergleich zu anderen kolorektalen Krebszelllinien sehr schnell proliferiert. So war bereits in den Proliferationsassays für RKO-E1 und den daraus etablierten Knockout-Klonen unter optimalen Kulturbedingungen eine Verdoppelung der Zellpopulationen innerhalb von 15 Stunden abzulesen. Nach Inkubation mit Hungermedium zeigten die korrespondierenden Zellklone jedoch je nach *BRAF*-Mutationsstatus große Unterschiede in der durchflusszytometrischen Analyse. Die G2/M-Population der in Hungermedium inkubierten RBW-1 war deutlich verkleinert. Ein ähnliches Muster konnte in den durchflusszytometrischen Analysen zu Apoptose und Nekrose reproduziert werden.

Die Abhängigkeit der RBW-1 Zellen von externen Wachstumsfaktoren wurde im Alamarblau-Assay bestätigt. Dabei zeigte sich, dass die Reduktion des Serums auch Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen hatte. Der Farbstoff wird von aktiven Zellen rasch reduziert und lässt unter Substratsättigung das Fluoreszenzsignal in Form einer Geraden nach Michaelis und Menten schnell ansteigen. Inaktive Zellen erzeugen dagegen einen langsameren Anstieg, vergleichbar dem Hintergrundsignal mit reinem Zellkulturmedium¹⁴⁰.

Sowohl im Proliferationsassay, als auch bei der Stoffwechselanalyse wurden die RBO-Klone und die parentalen Zellen nicht wesentlich durch den Serumentzug beeinflusst. Die generelle Beeinträchtigung der Proliferation unter zunehmendem Serummangel (siehe unterschiedliche Skalierung der y-Achsen in Abbildung 27) kann dabei als eine Anpassung an das begrenzte Nährstoffangebot angesehen werden. Die Überlebensstrategie der Zellen oder die grundsätzliche Zellprogrammierung änderten sich dabei offenbar nicht. Eine derartige Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren ist ein wesentliches Merkmal aller Krebszellen und wird als *Self-Sufficiency of Growth Signals* bezeichnet^{17 18}. Im Gegensatz dazu zeigte die korrespondierende Wildtyp-Zelllinie hinsichtlich Proliferation und Stoffwechsel-Aktivität das typische Verhalten einer Zelle aus Normalgewebe. Durch die Deletion der mutierten *BRAF*-Allele hatte RBW-1 die Fähigkeit zur Selbstversorgung mit Wachstumssignalen und somit ein zentrales Merkmal der Onkogenität verloren. Dass B-Raf^{V600E} in den untersuchten Zellen der alleinige Faktor für die permanente Aufrechterhaltung der Proliferation ist, steht im Einklang mit der Theorie, dass Mutationen von K-Ras und

B-Raf einander äquivalent sind und sich innerhalb eines Tumors gegenseitig ausschließen¹²⁹. Die durch Ras-Mutationen vermittelte Hyperaktivierung des MAPK-Signalwegs war eine der ersten beschriebenen Ursachen für die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen¹⁴¹.

Auf die klinische Situation übertragen, zeigt dieser Effekt eine vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung fortgeschrittener Tumorstadien. Durch Angiogenese-Hemmer, allen voran Antikörpern gegen den VEGF-Rezeptor, kann die Versorgung im Inneren des Tumors bereits entscheidend beeinflusst werden. In dieser Situation sind die Tumorzellen in besonderem Maße auf die Selbstversorgung mit Wachstumsignalen angewiesen. Da diese Kompetenz in RKO offensichtlich primär durch B-Raf^{V600E} vermittelt wird, besteht eine starke Rationale für die kombinierte Therapie mit Angiogenese-Hemmern und B-Raf inhibierenden Wirkstoffen.

Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen muss in ergänzenden Versuchen die molekulare Signaltransduktion in der humanen Krebszelle in Zusammenhang mit den tumorbiologischen Auswirkungen untersucht werden. Nachdem diese Fragestellungen *in vitro* nicht vollständig beantwortet werden können, könnte für zukünftige Arbeiten auf Xenograft-Modelle mit den hier beschriebenen RKO-Knockout-Klonen zurückgegriffen werden.

Dabei ist zu beachten, dass gerade für die Kombination dieser zwei Wirkstoff-Klassen eine unklare Datenlage vorliegt. Einerseits zeigten Versuche einer parallelen Inhibition des EGF- und des VEGF-Rezeptors durch Erlotinib und Bevacizumab in einem Melanom-Xenograft-Modell bereits in K-Ras bzw. B-Raf mutierten Tumoren synergistische Effekte¹⁴². Hierbei ist nicht klar, wodurch eine Resistenz gegenüber dem *Targeting* des EGF-Rezeptors durch die Mutationen in den nachgeschalteten Effektorinasen in diesem Modell vermieden wird. Andererseits scheint die Inhibition von B-Raf^{V600E} allein bereits eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese auszuüben^{13 143}.

5.2.2 Seneszenz

Die Expression von Onkogenen kann zur Induktion einer zellulären Seneszenz führen^{144 145 146}. Dieser Zusammenhang ist für B-Raf^{V600E} sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* beschrieben^{147 148}. Im Lauf der Tumorentstehung muss die zelluläre Seneszenz kompensiert oder überwunden werden. Im Einklang mit den mehrstufigen Modellen der Karzinogenese kann dies durch die genetische Aktivierung weiterer Onkogene geschehen. Dabei kann die Frage, welchen Effekt die Deletion mutierter *BRAF*-Allele in Tumorzellen auf das Seneszenz-Verhalten hat, nicht ohne Weiteres im Voraus beantwortet werden. Einerseits ist es möglich, dass die Zellen durch den Verlust eines zentralen Onkogens auf die seneszente Entwicklungsstufe zurückkehren und über einen längeren Zeitraum neue Kompensations-Mechanismen entwickeln. Gleichwohl ist es vorstellbar, dass die Überwindung der Seneszenz in RKO unabhängig von B-Raf^{V600E} erworben wurde. Demnach würde man keinen Zuwachs an seneszenten Zellen erwarten, da die von RKO bereits etablierten Resistenz-Mechanismen gegen zelluläre Seneszenz auch nach dem Knockout weiterhin bestehen bleiben.

Nach der Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität zeigte sich in den Zellklonen ein unterschiedliches Ausmaß an zellulärer Seneszenz. Jedoch war auch in den Proben mit dem stärksten Effekt nur ein kleiner Bruchteil der Zellen angefärbt. Dieser subjektive Eindruck, dass in keiner der analysierten Proben ein relevantes Ausmaß an zellulärer Seneszenz vorlag, wurde durch die quantitative Auswertung eindeutig bestätigt. Auch durch die quantitativen PCR-Analysen, soweit diese ausgewertet werden konnten, wurden keine Hinweise auf ein verändertes Seneszenz-Verhalten nach *BRAF*^{T1799A}-Knockout erhalten. Somit konnte gezeigt werden, dass die Überwindung zellulärer Seneszenz in RKO im Wesentlichen unabhängig vom B-Raf Status ist, und dass das *Targeting* von B-Raf^{V600E} nicht ausreicht, um ein für die Proliferationsrate relevantes Maß an Seneszenz in RBW-1 zu induzieren.

Während im Modell eine artifizielle Immortalisierung der Zellen eingesetzt werden kann, um eine B-Raf^{V600E}-vermittelte Seneszenz aufzuheben, ist zur Zeit wenig über die tatsächlichen Vorgänge in Tumorzellen bekannt¹⁴⁴. Zur Untersuchung dieser Fragestellung ist zunächst ein besseres Verständnis der Seneszenz-induzierenden Mechanismen, die derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen sind, erforderlich^{149 150 151}. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Modell korrespondierende Tumorzellklone könnte hierbei in zukünftigen Versuchen entscheidende Antworten liefern. Beispielsweise ließen sich in einem DNA-Microarray zwischen RBW- und RBO-Klonen differentiell regulierte Gene identifizieren, die im Kontext BRAF-vermittelter Seneszenz weiter analysiert werden könnten. Andererseits könnten gezielt bekannte Seneszenz-Faktoren in den Knockout-Klonen auf ihre Aktivität hin untersucht werden.

5.2.3 B-Raf^{V600E}-abhängige Apoptose-Resistenz

Nachdem in Vollmedium vergleichbare Zellzyklus-Verteilungen für alle Zellklone beobachtet wurden, zeigte RBW-1 unter Serumentzug einen bedeutenden Anstieg des Zellsterbens. In weiteren durchflusszytometrischen Analysen konnte Nekrose als zu Grunde liegende Ursache für den vermehrten Zelltod in RBW-1 ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde Apoptose im Western-Blot auf gespaltene Caspase 3 als der entscheidende Mechanismus für das differenzielle Zellsterben identifiziert. Der programmierte Zelltod kann im Einzelnen über zahlreiche unterschiedliche Caspase-Kaskaden verlaufen, deren gemeinsamer zentraler Baustein die Caspase 3 ist.

Nachdem eine erste Auswahl weiterer Apoptose-Marker im Western-Blot als nicht differenziell reguliert identifiziert wurde, wurde von einer Charakterisierung der Apoptose-Mechanismen im Detail abgesehen. Die Aktivierung apoptotischer Programme in RBW-1 unter suboptimalen Bedingungen kann demnach verschiedene Ursachen haben. Eine plausible Erklärung wäre ein Zusammenhang mit der beobachteten *Self-Sufficiency of Growth-Signals*. In diesem Fall würde der Verlust des Wachstums-Signales und die damit einhergehende reduzierte Stoffwechsel-Aktivität zur Auslösung der Apoptose führen. Gleichermäßen könnte eine Initiierung des Zellsterbens aufgrund des eingeschränkten Nährstoff-Angebot vor diesem Hintergrund angenommen werden. Hierbei wäre die Apoptose also weniger auf das Fehlen bestimmter Signalmoleküle, sondern vielmehr auf den Mangel von Stoffwechsel-Substraten zurückzuführen. Das in den mutierten Zellklonen verstärkte B-Raf Signal könnte dabei für eine endogene Synthese der benötigten Faktoren in den Zellen sorgen.

Analog zur Selbstversorgung mit Wachstumssignalen ist die Apoptose-Resistenz ein charakteristisches Merkmal für Krebszellen. Viele Krebspatienten profitieren aufgrund einer solchen Resistenz nicht von der Therapie mit Apoptosestimulanzien¹⁵². Durch die Deletion einer einzelnen genetischen Mutation konnte der Verlust dieser zentralen onkogenen Eigenschaft in RBW-1 Zellen induziert werden. Dieser Zusammenhang konnte für B-Raf zuerst im Rahmen der murinen Embryogenese beschrieben werden, wenn auch ohne Identifikation des zugehörigen Signalwegs¹⁵³. Zumindest für die anderen Mitglieder der Raf-Proteinfamilie sind antiapoptotische Mechanismen beschrieben, wie die Inhibition der Fas-Rezeptoren oder die Deaktivierung der proapoptotischen Kinasen ASK1 und MST2¹⁵⁴. Auch für B-Raf^{V600E} gibt es Hinweise auf Apoptose-relevante Zielproteine außerhalb des Mek/Erk-Signalweges¹⁵⁵. Patienten mit B-Raf^{V600E}-Mutation könnten demzufolge parallel zur Behandlung mit B-Raf Inhibitoren verstärkt auf Apoptose-stimulierende Therapien ansprechen.

5.2.4 Kontaktinhibition

Durch Resistenzen gegen Mechanismen zur Wachstumsbegrenzung ist es Tumorzellen möglich, das homöostatische Gleichgewicht zu überwinden. Die Umgehung einer Kontaktinhibition ist ein entscheidender Faktor für die Tumorinitiation und für die Fähigkeit zur Invasion.

Im Gegensatz zum vergleichbaren Wachstum unter standardisierten Bedingungen wurden aus hyperkonfluenten Zellkulturgefäßen weniger RBW-1 Zellen erhalten, als *BRAF*-mutierte Klone. Durch den Vergleich der Zellvolumina im Durchflusszytometer konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um einen Größeneffekt, sondern um eine Kontaktinhibition beim Wildtyp-Klon handelt.

Zudem wurden für RBW-1 nach hinreichend verdünnter Aussaat der Zellen und im subkonfluenten Wachstums morphologische Unterschiede beobachtet. Die Spindelform der Zellen kam nur dann zu Stande, wenn es zur Ausbildung kleiner Kolonien kommen konnte, in denen die Morphologie nicht an das begrenzte Raumangebot angepasst werden musste. Daher ist naheliegend, dass der beschriebene Effekt durch die Kontaktinhibition verursacht wurde, die ebenfalls nur in RBW-1 auftrat. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang ist, dass der Kontakt mit Nachbarzellen das Wachstum im Inneren der Kolonie verlangsamt. Aufgrund der geringen Koloniegröße und des ansonsten nicht eingeschränkten Platzangebotes könnten die Zellen dabei hinreichend mobil sein, um ein Gleichgewicht zwischen Kontaktinhibition und Zelldichte für eine Zeitlang aufrecht zu erhalten. Die Ausbildung von Parallelität und Spindelmorphologie würde dadurch nur in RBW-1 ermöglicht, während sich in *BRAF*-mutierten Zellen der Gleichgewichtszustand durch die fehlende Kontaktinhibition nicht einstellt.

Als ein Mechanismus für die Überwindung einer Kontaktinhibition ist ein verändertes Akt-Signaling in der Literatur beschrieben¹²⁵. Die Kinase Akt ist Bestandteil einer weiteren Signalkaskade unterhalb des EGF-Rezeptors. Sie wird initial aktiviert, indem Threonin³⁰⁸ durch PI3-abhängige Kinasen phosphoryliert wird. Akt aktiviert daraufhin den mTOR-Komplex (mTORC) indirekt über TSCi 1/2 und Rheb. Als eine Rückkopplungsschleife kann Akt wiederum durch mTORC an Serin⁴⁷³ phosphoryliert und damit weiter aktiviert

werden. Akt ist demnach kein direktes *Target* von B-Raf und im klassischen Modell linearer Signalwege kein Mitglied der Ras/Raf/Mek/Erk-Kaskade. Ein *Crosstalk* zwischen beiden Kaskaden kann jedoch entweder in Membrannähe zwischen K-Ras und der PI3-Kinase erfolgen, oder stromabwärts von Akt über Erk 1/2 und die TSC-Proteine. In dem Fall bewirkt phospho-Erk 1/2 analog zu Akt eine Inhibition von TSC 1/2 und ermöglicht dadurch die Aktivierung des mTOR-Komplexes durch Rheb.

Durch die Substitution von Adenosin³¹⁴⁰ durch Cytosin in Exon 20 des PIK3CA-Gens weisen RKO-Zellen eine Mutation in der katalytisch aktiven Untereinheit der PI3-Kinase auf. Der *BRAF*-Status der RKO-Knockout-Klone sollte demnach keinen Einfluss auf die initiale Aktivierung der Akt-Kinase haben. Im Einklang mit dieser Hypothese waren die Proteinspiegel für phospho-T³⁰⁸-Akt in allen Zellklonen gleichsam relativ hoch. Die Zellen hatten durch die *PIK3CA*-Mutation keine Möglichkeit zur Regulierung der Akt-Phosphorylierung an T³⁰⁸. Daher blieb das Signal auch unter schlechten Kulturbedingungen konstant, unter denen in PI3K-Wildtyp Zellen eine Reduktion des Wachstums-relevanten *Signalings* stattfinden würde. Der gleiche Effekt war auch für phospho-Mek 1/2 und phospho-Erk 1/2 erkennbar, deren Intensität in den V600E-mutierten Zellklonen mit 10 % und 0,5 % FBS vergleichbar war.

Durch parallele Hyperaktivierung von PI3-Kinase und Erk 1/2 in RKO besteht eine Redundanz in der zweiten Aktivierungsstufe von Akt. Daher wurde für RBW-1 eine Maskierung des Einflusses erwartet, den die Deletion des mutierten Allels auf die Akt-S⁴⁷³-Phosphorylierung ausübt. Diese Annahme wurde im Western-Blot widerlegt. Die konstitutive Phosphorylierung von Mek 1/2 und Erk 1/2 durch B-Raf^{V600E} verstärkte das phospho-S⁴⁷³-Signal der mutierten Klone im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.

Sowohl die Kontaktinhibition der RBW-1 Zellen, als auch die reduzierten Mengen an S⁴⁷³-phosphoryliertem Akt wurden gleichermaßen in Vollmedium und unter Serummangel beobachtet. Eine klare Zuordnung der Kontaktinhibition zu einer der beiden Phosphorylierungsstufen ist bislang nicht publiziert worden. Jedoch wird in allen Arbeiten zu dem Thema die Aktivierung an Serin⁴⁷³ entweder als alleiniger Marker oder ergänzend zu Tyrosin³⁰⁸ verwendet. Somit scheint der Konsens zu bestehen, dass erst die volle Akt-Aktivierung zur Überwindung der Kontaktinhibition führt. Somit kann der *downstream* von B-Raf erfolgende *Crosstalk* im Einklang mit diesen Literaturdaten für die Resistenz gegenüber der Proliferations-Kontrolle in V600E-mutierten Zellen verantwortlich gemacht werden.

Zudem deuten die Daten darauf hin, dass die Erk 1/2-Aktivität einen stärkeren Einfluss auf die Serin⁴⁷³-Phosphorylierung hat als Akt selbst. Eine wesentliche Reduktion der zweiten Aktivierungsstufe wurde in allen Zellklonen unter 0,5 % FBS beobachtet, während der T³⁰⁸-Rest unverändert stark phosphoryliert blieb. Schließlich war in hungernden RBW-1 nahezu kein phospho-S⁴⁷³-Akt mehr nachweisbar. Die Regulation der Rückkopplungsschleife schien in diesen Zellen trotz konstitutiv aktiver PI3-Kinase nicht beeinträchtigt zu sein. Somit erscheint es fraglich, ob im Zusammenhang mit der zweistufigen Aktivierung der Akt-Kinase von einer Autophosphorylierung gesprochen werden kann¹⁵⁶.

Die parallele Beeinflussung von zwei zentralen Signalwegen zeigt die herausragende Bedeutung der B-Raf^{V600E}-Mutation für Tumorzellen auf. Über die Rekonstitution einer Kontaktinhibition könnte in betroffenen

Tumoren die Proliferation verlangsamt werden. Unabhängig von der Versorgungslage der Zellen und damit vom Tumorstadium könnte eine Progression der Krankheit verzögert oder gar verhindert werden. Vor diesem Hintergrund könnten Patienten mit *BRAF*-Mutation bereits in frühen und mittleren Stadien der Krankheit entscheidend von einer personalisierten Behandlung mit B-Raf Inhibitoren profitieren.

Gleichzeitig scheint die V600E-Mutation in B-Raf aber nicht das volle onkogene Potenzial eines hyperaktivierten PI3K/Akt-Signalwegs zu entfalten. Der relativ große Anteil von Patienten mit kolorektalem Karzinom, die parallel zu Mutationen in B-Raf oder K-Ras eine *PIK3CA*-Mutation oder eine dazu weitgehend äquivalente *PTEN*-Inaktivierung aufweisen, lässt auf deutliche Selektionsvorteile doppelt mutierter Tumorzellen schließen^{131 132}.

5.3 Therapeutische Optionen

Es wurde gezeigt, dass die beobachteten zellbiologischen Phänotypen der RKO Knockout-Klone die für Krebszellen charakteristischen Kompetenzen an mehreren zentralen Stellen beeinflussen. Durch die herausragende Bedeutung der nach dem *BRAF*-Knockout differenziell regulierten Signalwege lagen Konsequenzen für das Ansprechen auf klinisch etablierte Wirkstoffe nahe.

Konventionelle Chemotherapeutika

Als klassische Chemotherapeutika wurden *Crosslinker*, Taxane und Inhibitoren des Nukleinsäure-Stoffwechsels an den Zellen getestet. Dabei traten keine Unterschiede in der Chemosensitivität zwischen RBW-1 und den *BRAF*-mutierten Klonen auf. Auch wenn aus der klinischen Forschung und Anwendung bisher keine Korrelation dieser Wirkstoffe mit dem B-Raf Status der behandelten Tumoren bekannt ist, war die durchgängig gleiche Sensitivität der Zellen nicht zwingend zu erwarten. Offenbar hat das B-Raf abhängige *Signaling* der Zellen keinen relevanten Einfluss auf den Nukleinsäure-Stoffwechsel, die DNA-Reparatur oder die strukturelle Organisation des Zytoskeletts.

EGFR-Antikörper

Durch aktivierende Mutationen im nachgeschalteten Signalweg, kann die Wirksamkeit einer Therapie, die auf der Inhibition des EGF-Rezeptors basiert, kompromittiert werden. Nach dem Knockout des onkogenen B-Rafs wurde der Wachstums-Rezeptor als potentiell therapeutisches Ziel in den RKO-abgeleiteten Klonen untersucht.

Zunächst wurde beobachtet, dass als Reaktion auf die Inkubation mit Serum-reduzierten Medium, die Expression des Rezeptors in allen Zellklonen hochreguliert war, um den Mangel an Wachstumssignalen auszugleichen. Dieser Mechanismus war in Wildtyp- und mutierten Zellen gleichermaßen intakt. Demnach wurde angenommen, dass der EGF-Rezeptor in RKO trotz *downstream* liegender B-Raf Mutation einen limitierenden Faktor für die Proliferation darstellt. Folglich wurde für mutierte Zellklone eine nachweisbare

Sensitivität auf die EGFR-Inhibition erwartet, und für RBW-1 eine deutliche Verschiebung dieser Sensitivität in Richtung niedrigerer Konzentrationen.

Im Sensitivitäts-Assay für Cetuximab wurden diese Vermutungen widerlegt, indem keine der Zelllinien eine Sensitivität auf den Antikörper zeigte. Es wurden Konzentrationen von bis zu $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eingesetzt, bei denen der Volumenanteil der Antikörperlösung im Zellkultur-Medium einen Wert von 20 % erreichte. Selbst in diesem supratherapeutischen Dosisbereich wurde nur eine kleine Verminderung der Zellproliferation erreicht, die dem Verdünnungseffekt des Nährmediums zugeordnet wurde. Obwohl der Wachstumsrezeptor unter Serumangel stärker exprimiert wurde, hatte dessen Inhibition keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen. Zudem war der Knockout von B-Raf^{V600E} allein nicht ausreichend, um RKO auf die EGFR-Therapie mit Cetuximab zu sensibilisieren. Vielmehr deutet die Aufrechterhaltung der Proliferation bis in die höchsten Dosisbereiche an, dass die Resistenz im verwendeten Modellsystem vollständig unabhängig von B-Raf sein könnte.

Als mögliche Kandidaten für die Vermittlung dieser Resistenz sind in RKO außer *BRAF* die Gene *NF1* und *PIK3CA* mutiert¹⁵⁷. *NF1* kodiert für Neurofibromin 1, das ein negativer Regulator der Ras-Kinaseaktivität ist und somit *upstream* von B-Raf einen Einfluss auf den EGFR-Signalweg ausübt. Nachdem in der funktionellen Verifikation des Knockout-Modells gezeigt wurde, dass die Deletion der mutierten *BRAF*-Allele zu einer starken Abnahme des nachgeschalteten Signalwegs führt, scheidet die *NF1*-Mutation als Vermittler der Cetuximab-Resistenz aus. Demnach ist anzunehmen, dass allein die aktivierende Mutation der PI3-Kinase in RKO für die Aufrechterhaltung der EGFR-unabhängigen Proliferation verantwortlich ist¹²⁷. Hierdurch wird insbesondere mit Hinblick auf die Ergebnisse der Proliferationsassays, in denen gezeigt wurde, dass die Proliferation der Zellklone unter optimalen Bedingungen unabhängig von B-Raf^{V600E} reguliert wird, die Rolle der PI3-Kinase für die Kontrolle des Zellwachstums unterstrichen¹⁵⁸.

B-Raf Inhibitoren

Als weitere zielgerichtete Wirkstoffe wurden sogenannte *Small Molecule Inhibitors* gegen B-Raf eingesetzt. Durch die Bindung an Serumproteine im Zellkulturmedium werden *in vitro* typischerweise große Substanzmengen für eine effektive Inhibition benötigt. In der Regel wird in solchen Fällen die verwendete Serumkonzentration im Nährmedium herabgesetzt. Da ein solches Vorgehen bei den verwendeten Zellklonen zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte (siehe Abbildung 27), wurde stattdessen der eingesetzte Konzentrationsbereich in Richtung hoher Konzentrationen ausgedehnt. Parallel wurden im Western-Blot die spezifische Inhibition der Mek 1/2- und Erk 1/2-Aktivität für die Substanzen überprüft. Die in den Chemosensitivitäts-Assays gefundenen Effekte konnten dadurch auf eine spezifische Unterdrückung des B-Raf Signals zurückgeführt werden.

Für Sorafenib als ersten klinisch eingesetzten Inhibitor gegen B-Raf wurde kein differenzielles Ansprechen zwischen Wildtyp- und V600E-mutierten Klonen gefunden. Nachdem Sorafenib im Vergleich mit modernen Inhibitoren ein unspezifisches Inhibitionsprofil aufweist, wurde der Wirkstoff im Western-Blot nicht weiter hinsichtlich der Aktivität des MAPK-Signalwegs untersucht.

In der Behandlung der Zellklone mit RAF265 zeigten RBW-1 ein tendenziell schwächeres Ansprechen. Der horizontale Abstand der Sensitivitätskurven auf Höhe des 50 %-igen Überlebens war jedoch sehr gering. Zudem zeigte RAF265 in den Phosphorylierungs-spezifischen Western-Blots für einige Zellklone einen nur schwachen Effekt auf Ebene von Erk 1/2. Auch ohne klares Bild dieser *in vitro*-Daten, ist die klinische Erprobung dieses Wirkstoff-Kandidaten besonders vielversprechend. Durch den parallelen Wirkmechanismus einer gleichzeitigen Inhibition des Angiogenese-vermittelnden VEGF-Rezeptors könnte RAF265 synergistische Effekte über die eingeschränkte Versorgung der Tumorzellen erzielen¹³. Die weitere Untersuchung dieser Fragestellung sollte daher an Tumoren im Rahmen eines Tiermodells erfolgen.

Die Behandlung der Zellen mit Vemurafenib ergab eine deutliche Verschiebung der Sensitivitätskurve für RBW-1 in Richtung hoher Konzentrationen um einen Faktor von 1,8. Im Western-Blot konnte analog zu RAF265 eine klare Wirkung auf die Mek 1/2-Phosphorylierung, aber nur eine partielle Wirkung auf den weiteren B-Raf Signalweg nachgewiesen werden. Wie auch im Fall von RAF265 ist vorerst unklar, wodurch die teilweise Kompensation des Erk 1/2-Signalings verursacht wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung müsste die Aktivität zahlreicher Signalmoleküle analysiert werden, die für die Vermittlung eines kompensatorischen Effektes in Frage kommen. Als ein erster Ansatz für zukünftige Versuche bietet sich die Inhibition der hyperaktivierten PI3-Kinase in den korrespondierenden Zellklonen an. Für ein vergleichbares *Targeting* sowohl der Ras/Raf/Mek/Erk-, als auch der PI3K/Akt-Kaskade wurden bereits erste Daten publiziert¹⁵⁹.

GSK2118436 zeigte einen starken Proliferations-hemmenden Effekt auf Zellklone mit V600E-Mutation, während RBW-1 erst bei deutlich höheren Konzentrationen ansprachen. Damit konsistent, wurde im Western-Blot eine durchgängige Inhibition der B-Raf Signalkaskade auf Höhe von Mek 1/2 und Erk 1/2 nachgewiesen. Der Effekt von GSK2118436 auf die Proliferation der Zellen konnte somit einer selektiven Reduktion der Kinase-Aktivität von B-Raf^{V600E} zugeordnet werden.

Als Zulassungskandidat gegen *BRAF*-mutierte, metastasierte Melanome wird für GSK2118436 in der nächsten Zeit auch mit zunehmenden klinischen Daten für das kolorektale Karzinom gerechnet. Nach den vorliegenden *in vitro*-Daten verfügt dieser Inhibitor über ein großes therapeutisches Potenzial, insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Mutationen sowohl in *BRAF*, als auch in *PIK3CA*. Gerade in dieser Subpopulation könnte GSK2118436 entscheidende Vorteile gegenüber anderen Wirkstoffen aufweisen, nachdem Mutationen der PI3-Kinase als Vermittler einer Vemurafenib-Resistenz bekannt sind^{160 161}.

Bei den Sensitivitäts-Analysen mit B-Raf Inhibitoren fiel vor allem eine Korrelation der Selektivität hinsichtlich der V600E-Mutation mit der Entwicklungsgeneration des Wirkstoffs auf. Während der unspezifische Multikinase-Inhibitor Sorafenib keinen differenziellen Effekt in den Knockout-Klonen erzeugte, zeigte RAF265 einen Trend für RBW-1. Eine deutlich niedrigere Proliferation in Zelllinien mit B-Raf^{V600E} wurde mit Vemurafenib und GSK2118436 erreicht. Damit wurde auf zellulärer Ebene gezeigt, dass die modernen Wirkstoffe eine zielgerichtete und Mutations-spezifische Wirkung entfalten. Diese Selektivität wurde zuvor vor allem an aufgereinigtem rekombinantem Protein und damit außerhalb biologischer Systeme nachgewiesen^{162 14}.

Erweiterte Chemosensitivitäts-Assays

In zukünftigen Versuchen sollte das Spektrum der an den korrespondierenden Zellklonen getesteten therapeutischen Strategien auf kombinierte Regime wie FOLFIRI ausgeweitet werden. Zudem sollten einzelne Apoptose-induzierende Wirkstoffe mit einem der beiden wirksamen B-Raf Inhibitoren kombiniert werden. Nachdem gezeigt wurde, dass B-Raf^{V600E} Apoptose-Resistenz vermittelt, könnte das Ansprechen mutierter Zellen durch eine parallele therapeutische Strategie verbessert werden. Darüber hinaus erscheinen Kombinationen aus PI3K-Inhibitoren und Vemurafenib oder GSK2118436 sinnvoll. Einerseits kann hierbei herausgefunden werden, ob sich die Wirksamkeit von Vemurafenib durch das parallele *Targeting* auf das Niveau von GSK2118436 steigern lässt. Andererseits kann möglicherweise mit beiden B-Raf Inhibitoren ein additiver Effekt durch die kombinierte Behandlung erzielt werden. Ein solcher Effekt sollte ggf. hinsichtlich einer möglichen Prävention oder Verzögerung der Metastasierung untersucht werden.

Analog zu den kombinierten Regimen konventioneller Chemotherapeutika wären in einem nächsten Schritt Kombination aus B-Raf Inhibitoren, PI3-Kinase Inhibitor und EGFR-Antikörper zu untersuchen. Nachdem dadurch alle relevanten hyperaktiv-mutierten Signal-Effektoren gezielt inhibiert würden, sollte die Resistenz gegen EGFR-Inhibition aufgehoben sein und die Zellen vermehrt auf die Antikörper ansprechen.

Das besondere Potential des B-Raf Inhibitors RAF265 liegt in der parallelen Wirkungsweise als Angiogenese-Hemmer. In einem entsprechenden Modell untersucht, könnten parallel die Kombinationen aus einem VEGFR-Antikörper und den alternativen B-Raf Inhibitoren Vemurafenib und GSK2118436 analysiert und mit der Wirkung von RAF265 verglichen werden¹³.

5.4 Reproduktion des Knockout-Phänotyps durch RNAi

Nachdem die Transfektion mit siRNA nicht zur RNA-Interferenz in RKO eingesetzt werden konnte, wurden shRNA-Klone etabliert und auf den entscheidenden Ebenen des Signalwegs funktionell verifiziert. Sowohl RKO-E1, als auch RBOW reagierten unter der *BRAF*-spezifischen RNA-Interferenz auf Serummangel entgegen der Erwartung, indem die apoptotische Subpopulation unter Induktion der RNA-Interferenz reduziert wurde. Dieses Ergebnis steht sowohl mit den Beobachtungen aus dem Knockout-Modell, als auch mit publizierten Daten in Widerspruch^{163 164}. Es kann anhand bekannter Signalwege nicht mechanistisch erklärt werden und stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Artefakt dar.

In dem beschriebenen Kontrast wird erneut das höhere Evidenzniveau genetischer Modelle gegenüber artifiziellen Methoden deutlich. Durch den homogenen Hintergrund und die kontrollierte Modifikation eines einzelnen Genlokus wird im *Somatic Cell Gene Targeting* ein Satz genetisch korrespondierender Zellen hergestellt. Hingegen werden die Zellen zur Induktion von RNA-Interferenz je nach Methode durch Transfektion oder Doxycyclin-Stimulation zusätzlich beeinflusst und einem gewissen Maß an Stress ausgesetzt. Knockout-Zellen können demgegenüber ohne weitere Stressfaktoren unter

Standardbedingungen kultiviert und beobachtet werden. Das Auftreten von Artefakten und *off-target* Effekten kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

5.5 Tiermodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Erstellung eines B-Raf^{V600E} Tiermodells verfolgt. Trotz der grundlegend verschiedenen Strategien konnte mit keiner der angewendeten Methoden ein genetisch manipulierter Mausstamm etabliert werden. Die Ursachen hierfür sind unklar und konnten auch nach intensiver Fehlersuche und mit Hilfe erfahrener Tiermediziner nicht ermittelt werden.

Für die zukünftige *in vivo*-Untersuchung der in den RKO-Klonen gefundenen Phänotypen muss daher auf bereits existierende Modelle zurückgegriffen werden. Nachdem bereits in den nicht-genetischen *in vitro*-Modellen Artefakte aufgetreten sind, sollte bei der Auswahl des Tiermodells auf ein möglichst physiologisches Setup zurückgegriffen werden. Als ein in dieser Hinsicht besonders elegantes System ist die LSL-*Braf*^{V600E}-Mauslinie etabliert worden, bei der auf einem endogenen *Braf*-Allel eine V600E-äquivalente Mutation induziert werden kann¹⁶⁵.

5.6 Spleißen

5.6.1 Neue *BRAF*-Spleißvarianten

Bei Klonierungsarbeiten wurde eine in Exon 14 und Exon 15 deletierte Variante der *BRAF*-mRNA parallel zu deren Erstbeschreibung entdeckt, deren Anteil in RKO bei über 5 % lag. Die Autoren der Originalpublikation konnten die neue Isoform in verschiedenen Zelllinien, nicht aber in RKO nachweisen⁸⁰. Die dabei verwendete Methode hochauflösender Schmelzkurven ist demnach der hier eingesetzten Klonierung und Sequenzierung von cDNA-Amplifikaten hinsichtlich ihrer Sensitivität deutlich unterlegen.

Neben der inzwischen publizierten Isoform wurden drei weitere Transkript-Varianten in RKO entdeckt. Während diese im Gegensatz zur deletierten Isoform zusätzliche Sequenzen auf mRNA-Ebene aufweisen, waren alle alternativen B-Raf Varianten auf Proteinebene C-terminal verkürzt. Die neu entdeckten Exons wurden dabei von AG- und GT-Sequenzen flankiert, die beim Spleißen als Akzeptor bzw. Donor fungieren. Die zugehörigen Introns weisen darüber hinaus einen Polypyrimidin-Trakt und ein Adenosin auf, das als *Branch-Point* dienen kann. Somit sind alle Schlüsselmotive des klassischen GT-AG-Typs eines Introns vorhanden. Diese Sequenzen liegen gleichsam in der Sequenz des humanen Referenz-Genoms vor. Daher ist es naheliegend, dass die drei zusätzlichen Exons auch in anderen Zelltypen und Geweben in einem relevanten Anteil der *BRAF*-Transkripte auftreten.

Allen alternativ gespleißten Transkripten fehlen Informationen für hochkonservierte Struktur motive zur ATP-Bindung und Transaktivierung. Der Translationsabbruch findet jeweils kurz vor oder innerhalb der Kinase-Domäne statt. Für die Deletionsvariante und Transkripte mit Exon 15a, Exon 16a und Exon 16b

werden die ersten 1 700 bis 2 000 Nukleotide der *BRAF*-CDS translatiert. Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass von keiner der Isoformen eine Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs ausging.

Unter der Annahme, dass die alternativen Isoformen auch unter physiologischen Bedingungen korrekt gefaltet werden und stabil sind, würde eine RKO-Zelle insgesamt etwa 9 % inaktives B-Raf Protein enthalten. Nachdem Seth *et al.* die Deletionsvariante in verschiedenen Zelllinien, nicht aber in RKO nachweisen konnten, könnten andere Zelltypen über wesentlich mehr Kinase-inaktives B-Raf verfügen. Falls die Zellen den Anteil dieser Transkripte durch eine Beeinflussung des Spleißvorgangs kontrollieren können, besteht darin möglicherweise ein Kontrollmechanismus für die Aktivität des EGFR-Signalweges. Ähnlich den *Decoy*-Rezeptoren, die als eine Art Attrappe Liganden binden ohne das entsprechende Signal zu transduzieren, könnten die verkürzten B-Raf Moleküle Ras-Bindungs-Ereignisse und damit ein gewisses Maß an Ras-Aktivität absorbieren. Dadurch würde das Phosphorylierungs-Potential der Ras-Kinasen nicht mit vollem Wirkungsgrad auf die unteren Ebenen der Signalkaskade weitergeleitet. Je nach Ausmaß des alternativen Spleißens könnten die Zellen so ihre Sensitivität auf Ras-vermittelte EGF-Signale regulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine noch unbeschriebene genetische Mutation im *BRAF*-Gen entdeckt, die keine Mutation auf Aminosäure-Ebene nach sich zog, aber die Zuordnung verkürzter Transkripte zum jeweiligen Ursprungs-Allel ermöglichte. Dadurch konnte einerseits gezeigt werden, dass alle drei *BRAF*-Allele in RKO gleich stark exprimiert wurden. Eine Regulation, die über die Allel-Duplikation durch Aneuploidie hinausging, fand nicht statt. Außerdem konnte durch die Punktmutation nachgewiesen werden, dass, anders als bisher vermutet, die Entstehung alternativer Transkripte nicht vom Mutationsstatus des Allels abhängig ist⁸⁰.

5.6.2 Mechanistische Unterschiede im Spleißen von *BRAF*

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zur Entwicklung von Resistenzen gegen B-Raf Inhibitoren erweckte große Aufmerksamkeit für p61-BRAF(V600E), eine neuartige *BRAF*-Spleißvariante⁸¹. Einige N-terminale Exons waren sowohl *ex vivo* in Proben aus Vemurafenib-resistenten Tumoren, als auch in Einzelklonen einer Melanom-Zelllinie mit erworbener Resistenz nachweisbar. Verschiedene Befunde der Originalarbeit sprechen für eine quantitative Transkription der Variante vom mutierten *BRAF*-Allel. Zum einen trat p61-BRAF(V600E) im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Proteinvarianten in gleichen oder größeren Mengen auf als das nicht verkürzte Protein. Zum anderen entwickelte sich die neue Isoform ausschließlich vom mutierten *BRAF*-Allel. Und schließlich resultierte die RNA-Interferenz gegen die verkürzte Kinase in einer verminderten Mek 1/2-Phosphorylierung und weiteren Wachstums-Effekten, während RNAi gegen die Konsensus-Sequenz keine Veränderungen hervorrief. Demnach muss angenommen werden, dass alle Transkripte, die in den betroffenen Zellen aus dem onkogen mutiertem Allel entstanden, die N-terminale Deletion aufwiesen.

Anhand dieser Ergebnisse können die Spleißvarianten des *BRAF*-Gens in zwei grundsätzlich unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Dabei wird die Einschätzung der Autoren, dass es sich bei p61-BRAF(V600E) tatsächlich um eine Spleißvariante handelt und nicht um eine durch Deletion

genomischer Sequenzen entstandene Mutante, unter Vorbehalt übernommen. Ein Nachweis dafür wurde bisher nicht publiziert und steht möglicherweise noch aus.

Der quantitativen Expression eines *BRAF*-Allels als alternative Isoform müssen starke regulatorische Ursachen zu Grunde liegen. Die nachhaltige Veränderung einzelner für das Spleißen essentieller Konsensus-Motive ist eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. Nachdem Poulidakos *et al.* keine Aussagen zur Reversibilität des alternativen Spleißens nach Beendigung des Selektionsdruckes machen, können intensive epigenetische Veränderungen nicht als Ursache ausgeschlossen werden. Ungleich wahrscheinlicher ist jedoch die Entstehung der Spleißvariante durch genetische Mutationen in funktionalen Sequenzmotiven wie Spleiß-Donoren oder -Akzeptoren.

Beim klassischen Typ des alternativen Spleißens entsteht ein grundsätzlich anderes Verteilungsmuster der Proteinvarianten als für p61-BRAF(V600E) beschrieben wurde. Dabei werden die Vorläufer-RNAs aller Allele zu einem gewissen Anteil abweichend gespleißt. Analog einem Hintergrundrauschen entstehen die alternativen Transkripte neben der Konsensus-mRNA.

Zunächst wurde vermutet, dass die in Exon 14 und Exon 15 deletierte B-Raf Variante ausschließlich von Wildtyp-Allelen hervorgebracht wird⁸⁰. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Transkripte der 71,2 kDa-Variante unabhängig vom *BRAF*-Mutationsstatus gebildet werden. Somit entstehen alle hier untersuchten *BRAF*-Spleißvarianten durch klassisches Hintergrund-Spleißen.

Sowohl durch diesen Befund, als auch hinsichtlich der ungeklärten Klassifikation von p61-BRAF(V600E) als Spleißvariante bleibt es fraglich, ob im *BRAF*-Genloкус tatsächlich ein neuartiges Mutations-abhängiges Prinzip des alternativen Spleißens vorliegt, wie es durch die genannten Arbeiten nahegelegt wird.

5.7 *Cdh1*-Modell

Die Rolle von E-Cadherin in der intestinalen Homöostase wurde in einem konditionalen Knockout-Tiermodell untersucht. Aufgrund seiner Funktion als Zellkontakt-vermittelndes Strukturprotein wird für E-Cadherin ein Beitrag zur physischen Barrierefunktion des Darmepithels vermutet. Dieser Zusammenhang wurde bereits während der experimentellen Phase durch eine hohe Sensibilität der *Cdh1*-defizienten Tiere auf Veränderungen des Flüssigkeitshaushalts abgebildet. Im Folgenden wurden sowohl epitheliale Effekte, als auch die Bildung von Entzündungen im Darm der Tiere histologisch untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt war der Einfluss von E-Cadherin auf die Sekretion bakterizider Peptide in der Darmschleimhaut.

Im Tierversuch kam es durch intensive Tamoxifengaben zum Exitus, während die Versuchstiere mit mildereren Rekombinationsprotokollen überlebten. Offenbar kam es durch die Behandlung in sehr kurzen Intervallen zu einer nahezu vollständigen Rekombinierung, und in der Folge zu einem erheblichen Wasserverlust durch blutige Diarrhö, der für die Mäuse tödlich war. Nach einer zeitlichen Entzerrung der

Tamoxifen-Injektionen konnte ein nicht letaler Phänotyp erreicht werden. Aufgrund der hohen Proliferation im Darmgewebe war die intestinale Architektur dabei weniger stark von strukturellen Defekten betroffen.

Trotz der hohen Regenerationsfähigkeit des Darmes und der weitgehenden strukturellen Integrität im milden Setup konnten eindeutige Effekte in der Zelldifferenzierung beobachtet werden. Davon waren vor allem die Defensin-sekretierenden Paneth-Zellen betroffen, die nicht mehr in voller Anzahl ausreifen und darüber hinaus nicht ihr volles Sekretionspotential erreichten. Daneben wurden in weiteren Versuchen auch Hinweise auf Veränderungen der Becherzell-Differenzierung gefunden¹²⁸. Paneth-Zellen und Becherzellen werden im adulten Organismus aus den gleichen Vorläuferzellen des endokrinen Systems gebildet¹⁶⁶. Somit konnte nachgewiesen werden, dass E-Cadherin für die Differenzierung und Ausreifung sekretierender intestinaler Zellen essentiell ist.

Als Folge der verminderten Sezernierung antibakterieller Peptide kam es in E-Cadherin defizienten Tieren zu einer vermehrten Invasion von Bakterien. Die Mucine bzw. Defensine sind Teil der antibakteriellen Barriere im Darm, mit der sich der Organismus vor Infektionen schützt. Der Rekombinase-vermittelte *Cdh1*-Knockout allein war insbesondere im milden Tamoxifen-Protokoll nicht ausreichend, um eindeutige inflammatorische Reaktionen im Darm der Tiere hervorzurufen.

Um ausschließen zu können, dass das Fehlen entzündlicher Reaktionen auf histologischer Ebene durch die spezifisch-pathogenfreien Haltungsbedingungen hervorgerufen wurde, wurde ein Langzeit-Versuch mit chronischen Schädigungen durch regelmäßige Tamoxifen-Gaben in einem Tierstall niedrigeren Standards durchgeführt.

Durch einen zeitweiligen Befall der Tiere mit Darmparasiten konnte in diesem Versuch der Zusammenhang zwischen *Cdh1*-Defizienz und der erhöhten Sensibilität auf Störungen des Flüssigkeitshaushaltes belegt werden. Durch die Gabe von Metronidazol über das Trinkwasser und dem damit einhergehenden bitteren Geschmack nahmen die Tiere beider Gruppen weniger Flüssigkeit auf. Durch die vom *Cdh1*-Knockout hervorgerufene Beschädigung des Darmepithels kam es in Verum-Tieren zu einem verstärkten Wasserverlust über den Darm und einer rapiden Gewichtsabnahme. Im Allgemeinen können Infektionen, die während der Experimentalphase von Tierversuchen auftreten, die wissenschaftliche Aussagekraft von Daten aus Tierversuchen erheblich einschränken¹⁶⁷. Doch wurden in diesem Fall gerade durch die differenzielle Reaktion der Versuchstiergruppen auf eine ungeplante Infektion bzw. deren Behandlung klare Belege für einen grundsätzlichen Phänotyp erhalten.

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen, wurden jedoch auch hier keine Anzeichen einer Entzündung in den Versuchstieren gefunden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer aktuellen Studie, nach der Umweltbedingungen und Hygienefaktoren eine untergeordnete Rolle für entzündliche Darm-erkrankungen spielen¹⁶⁸.

Die Expression von Wildtyp E-Cadherin kann vor Colitis und inflammatorisch induzierter Karzinogenese schützen^{169 170}. Gleichzeitig sind Polymorphismen im *CDH1*-Gen mit Morbus Crohn assoziiert¹⁷¹.

Andererseits rief in dieser Arbeit der Verlust des Strukturproteins ohne weitere Behandlung der Tiere zwar morphologische Schädigungen, aber keine Entzündungsreaktionen im Darm der Versuchstiere hervor. Demnach scheinen für die Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen mehrere Faktoren nötig zu sein. Um die Villin-Cre-ER^{T2};Cdh1^{fl/fl} Mauslinie als Modellsystem zur Untersuchung dieser Erkrankungen zu etablieren, müssen demnach weitere Risikofaktoren im Tierversuch simuliert werden. In einem weiteren Versuch wird aktuell die Suszeptibilität der *Cdh1*-Knockout Mäuse gegenüber der chemischen Induktion einer Colitis untersucht. Besonderes Augenmerk wird dabei auf eine mögliche Heilung oder chronische Entwicklung der Krankheit nach der Gabe von Natrium-Dextransulfat (DSS) gelegt. Erste Daten bestätigen bereits die Beobachtung, dass Tiere ohne E-Cadherin im Fall einer entzündlichen Darmerkrankung mit einem sowohl schnelleren, als auch höheren Gewichtsverlust reagieren als Kontrolltiere ⁽¹⁷²⁾.

6 Summary

6.1 V600E mutation of B-Raf

In order to establish a genetic model of B-Raf^{V600E} mutated colorectal cancer cells and corresponding wild-type tumor cells, the method of somatic cell gene targeting was successfully applied for the first time in Germany. Using this approach it was demonstrated that RKO cells show an oncogene addiction for B-Raf^{V600E}. Furthermore, self-sufficiency of growth signals and resistance against apoptosis were found to be B-Raf^{V600E} dependent effects. Moreover, contact inhibition of proliferation was found in RBW-1 wild-type cells while it was abrogated in V600E mutated cell clones by an increased phosphorylation of Akt kinase.

Therefore, four crucial hallmarks of cancer were dependent on the B-Raf^{V600E} mutation. Presumably due to a mutation of PI3 kinase in RKO cells other oncogenic mechanisms were still intact in RBW-1 wild-type cells. Namely the high proliferation rates under optimal conditions and the increase of *EGFR* expression under serum deprivation were independent from *BRAF* mutation status. Additionally, *BRAF* wild-type cells kept their immortality and still showed no relevant amount of cellular senescence.

6.2 Alternative splicing of *BRAF* transcripts

New splicing variants of the *BRAF* gene were found and characterized. The correspondent gene products showed no kinase activity and were detectable in amounts that indicate a physiological role. New insights into the allelic origin of alternative isoforms have been gained facilitating the interpretation of published data.

6.3 E-Cadherin in intestinal homeostasis

It has been shown that E-Cadherin mediated cell-cell contacts are essential for the epithelial contribution of the intestinal barrier. Moreover, the role of E-Cadherin in the maturation of secreting cells in the intestine was determined, elucidating a crucial role in the defense against bacterial invasion.

7 Zusammenfassung

7.1 V600E-Mutation in B-Raf

Für ein genetisches Modell B-Raf^{V600E}-mutierter Darmkrebszellen und korrespondierender Wildtyp-Zellen wurde erstmalig in Deutschland das *Somatic Cell Gene Targeting* eingesetzt. Dabei konnte demonstriert werden, dass RKO eine *Oncogene Addiction* bezüglich der *BRAF*-Mutation aufweist. Als weitere B-Raf^{V600E}-abhängige Effekte wurden die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen (*Self-Sufficiency of Growth Signals*) und die Resistenz gegen Apoptose in dem Modell festgestellt. Darüber hinaus war die proliferative Kontaktinhibition in V600E-mutierten Klonen durch eine verstärkte Akt-Phosphorylierung aufgehoben und wurde nach Knockout der mutierten Allele im Wildtyp-Zellklon RBW-1 wieder hergestellt.

Somit konnten vier zentrale Merkmale der Onkogenität dem mutierten B-Raf^{V600E} zugeordnet werden. Andere onkogene Mechanismen waren dagegen vermutlich aufgrund einer Mutation der PI3-Kinase auch in *BRAF*-Wildtyp-Zellen noch intakt. So waren das Wachstum unter guten Kulturbedingungen und eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors unter Mangelbedingungen nicht vom *BRAF*-Mutationsstatus abhängig. Außerdem behielten Wildtyp-Zellen ihre Immortalisierung bei und zeigten weiterhin kein relevantes Auftreten von Seneszenz.

7.2 Spleißen von *BRAF*-Transkripten

Es wurden neue Spleißvarianten des *BRAF*-Gens gefunden und basal charakterisiert. Die alternativen Transkripte zeigten keine Kinase-Aktivität und waren in einem Ausmaß nachweisbar, das eine physiologische Bedeutung vermuten lässt. Hinsichtlich der Herkunft-Allele alternativer Isoformen und den Ursachen für das Auftreten alternativen Spleißens wurden neue Erkenntnisse gewonnen, die zudem die Interpretation publizierter Daten erleichtern.

7.3 E-Cadherin in der intestinalen Homöostase

Es wurde gezeigt, dass die durch E-Cadherin vermittelten Zellkontakte essentiell für die epitheliale Komponente der intestinalen Barriere sind. Darüber hinaus wurde der Einfluss von E-Cadherin auf die Ausreifung sekretierender Zellen im Darm ermittelt und damit ein weiterer entscheidender Mechanismus der Abwehr bakterieller Invasionen aufgeklärt.

8 Danksagung

Prof. Dr. Frank T. Kolligs und PD Dr. Andreas E. Herbst danke ich für herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für eine fantastische Betreuung, für ausgiebiges Diskutieren von Ergebnissen und großartige Hilfe bei strategischen und technischen Fragen. Sie haben diese Arbeit ermöglicht und hatten immer eine offene Tür und zwei offene Ohren.

Für die theoretische Vermittlung und praktische Begleitung des *Somatic Cell Gene Targetings* danke ich Dr. Eike Gallmeier. Bei Andreas Ziesch bedanke ich mich für seinen unermüdlichen Einsatz in der Zellkultur.

Andrea Ofner und Maximilian Marschall danke ich für die technische Unterstützung und für ungezählte Handgriffe an der Laborbank und in der Zellkultur.

Den Kooperationspartnern am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich herzlich für die Hilfe bei der Planung und Umsetzung der Tierversuche. Besonderer Dank an Jessica Grill für spontane Crash-Kurse und Tierversuch-Tutorien. Dank an Dr. Marlon R. Schneider und Felix N. Hiltwein für die gute Zusammenarbeit.

Am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich Prof. Dr. Andreas Jung für die Hilfe bei histologischen Färbungen, Dr. David Horst für die fachkundige Beurteilung derselben und Monika Attmannspacher für viel Auflösung und wenig Bürokratie.

Bei Dr. Konrad Trülzsch vom Max von Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich für die gute Kooperation im Rahmen der Arbeiten mit *Yersinia*-Bakterien.

Vor allem aber danke ich meiner Jessi.

Für uneingeschränkten Rückhalt trotz vieler Einschränkungen in der zurückliegenden Zeit.

Für einen geordneten Rückzug nach chaotischen Tagen und Nächten im Labor.

Für das moralische Aufbauen, wenn alles einzustürzen drohte.

Für den Glauben an unglaubliche Projekte.

9 Materialien und Software

9.1 Puffer und Lösungen

Angegeben werden die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen, soweit diese nicht allgemein gebräuchlich oder kommerziell erhältlich sind.

Phosphoprotein-Lysispuffer

20 mM Tris
150 mM NaCl
50 mM β -Glycerophosphat
10 mM NaF
10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
1 mM EDTA
ad pH = 7,4 HCl
1 % Triton X-100
1 mM Na_3VO_4 (frisch zugesetzt)

PCR-Färbelösung

50 Vol-% Glycerol
17 % Saccharose
0,3 % Tartrazin
0,15 % Kresolrot

DMEM-Vollmedium

1 x DMEM
10 % FBS
100 000 units $\cdot \text{L}^{-1}$ Penicillin
100 g $\cdot \text{L}^{-1}$ Streptomycin

TBF I

30 mM KOAc
100 mM CaCl_2
Autoklavieren
ad 50 mM MnCl_2 (filtersterilisiert)

TBF II

10 mM MOPS
75 mM CaCl_2
10 mM KCl
15 % Glycerol
Autoklavieren

Nicoletti-Puffer

0,1 % Natriumcitrat
0,1 % Triton X-100
50 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ Propidiumiodid
ad pH = 7,4 Citronensäure

Ponceau S-Lösung

5 % Essigsäure
0,1 % Ponceau S

Mini-1

25 mM Tris
10 mM EDTA
5 mM Glucose
ad pH = 8,0 HCL
100 mg · L⁻¹ RNase A
Lagerung bei 4°C

Mini-2

0,2 mM Natriumhydroxid
1 % Natriumdodecylsulfat

Mini-3

3 M Kaliumacetat
pH = 4,6 bis 4,8 kontrollieren

X-gal Färbelösung

20 Vol-% Phosphat-Citrat-Puffer
150 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II)
5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III)
2 mM Magnesiumchlorid
1 g · L⁻¹ X-gal

Phosphat-Citrat-Puffer

36,85 mM Citronensäure
126,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat
pH = 6,0 kontrollieren

Methylenblau-Lösung

0,6 g · L⁻¹ Methylenblau
60 mL Glutaraldehyd-Lösung (25 % in Wasser)
ad 1 L PBS
Filtrieren

2x Lämmli-Puffer

125 mM Tris
20 % Glycerin
4 % Natriumdodecylsulfat
0,02 % Bromphenolblau
ad pH = 6,8 HCl

Laufpuffer (SDS-PAGE)

14,4 g · L⁻¹ Glycin
3,02 g · L⁻¹ Tris
1 g · L⁻¹ Natriumdodecylsulfat

Transferpuffer (Western-Blot)

14,4 g · L⁻¹ Glycin
3,02 g · L⁻¹ Tris
10 Vol-% Methanol

Azokarminrot-Färbelösung

1,0 g · L⁻¹ Azokarmin G
Aufkochen und abkühlen lassen
Durch ein Papierfilter filtrieren
1 Vol-% Essigsäure

9.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial Labor

Alle üblichen Laborchemikalien wurden über die Firmen Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen. Reaktionsgefäße und Kunststoff-Verbrauchsmaterial stammten von Sarstedt AG & Co, Wiehl, Eppendorf AG, Hamburg, sowie BD Biosciences, Heidelberg.

Verbrauchsmaterial Zellkultur

Zellkulturreagenzien, -medien und -supplemente wurden bei PAA Laboratories GmbH, Cölbe geordert, mit Ausnahme von Lipofectamine 2000 und OPTI-MEM (beide von Life Technologies GmbH, Darmstadt). Kunststoffmaterialien für die Zellkultur wurden von TPP Techno Plastics Products AG, Trasadingen CH, von BD Biosciences, Heidelberg und von Orange Scientific n.v./s.a., Braine-l'Alleud B bezogen. Die verwendeten Antibiotika stammten von PAA Laboratories GmbH, Cölbe (Hygromycin B, G418-Sulfat), Invivogen, Toulouse F (Blasticidin, Zeocin) und Carl Roth GmbH + Co KG (Ampicillin, Kanamycin).

Enzyme

Enzymatische Reagenzien für molekulare Klonierungen wurden überwiegend bei Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bestellt. Die Restriktionsendonuklease *PacI* wurde von New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main bezogen. Für die PCR wurden Polymerasen von Nippon Genetics Europe, Düren (KAPA Taq, KAPA Extra-Taq), Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (Finnzymes Phusion HotStart Polymerase), Agilent Technologies, Waldbronn (Stratagene Paq5000 DNA-Polymerase) und Qiagen, Hilden (Qiagen HotStar Taq Polymerase) eingesetzt.

Wirkstoffe

Konventionelle Chemotherapeutika und Cetuximab-Lösung wurden in der Klinikapotheke des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern direkt vor Versuchsbeginn zubereitet.

GSK2118436 (alte Bezeichnungen: BCP0236, SB-590885) wurde von GlaxoSmithKline LLC, Collegeville USA bereitgestellt und bei -20°C in DMSO gelagert.

RAF265 (alte Bezeichnung: CHIR-265) und Vemurafenib (alte Bezeichnungen: PLX4032, RG7204, RO5185426) wurden über die Absource Diagnostics GmbH, München von Selleck Chemicals LLC, Boston USA bezogen und nach Lösen in DMSO bei -20°C gelagert.

9.3 Antikörper

BD Pharmingen, BD Biosciences, Heidelberg

Cytochrom C Artikel-Nr.: 556433

BD Transduction Laboratories, BD Biosciences, Heidelberg

p21^{Cip1} Artikel-Nr.: 610233

E-Cadherin Artikel-Nr.: 610181

Cell Signaling Technology, New Englang Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

pan Akt (total Akt) Artikel-Nr.: 4691

phospho-Akt (T³⁰⁸) Artikel-Nr.: 2965

phospho-Akt (S⁴⁷³) Artikel-Nr.: 4060

B-Raf Artikel-Nr.: 9434

Caspase 3 Artikel-Nr.: 9665

Caspase 8 Artikel-Nr.: 9746

pan Erk 1/2 (total Erk 1/2) Artikel-Nr.: 4695

phospho-Erk 1/2 (T^{202/185}, Y^{204/187}) Artikel-Nr.: 4370

pan Mek 1/2 (total Mek 1/2) Artikel-Nr.: 9122

phospho-Mek 1/2 (S^{218/222}, S^{222/226}) Artikel-Nr.: 9121

GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont UK

ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole Antibody (from sheep) Artikel-Nr.: NA931V

ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole Antibody (from donkey) Artikel-Nr.: NA934V

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

EGFR (1005) Artikel-Nr.: sc-03

9.4 Oligonukleotide

RNA

Zur RNA-Interferenz wurden siRNA-Sequenzen aus dem siGENOME-Programm von Dharmacon Products, Thermo Fisher Scientific, Lafayette USA eingesetzt. Die Sequenzen siBRAF-01 und siBRAF-05 entsprechen den Katalognummern D-003460-01 bzw. D-003460-05.

DNA

Alle DNA-Oligonukleotidsequenzen und deren Eigenschaften wurden über den Onlinedienst Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt und berechnet. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden über die Metabion International AG in 82152 Martinsried bezogen, in vollentsalztem Wasser *ad* 100 mM gelöst und bei -20°C gelagert.

gBRAF-300FW	gccccaaaaatcttaaagca
gBRAF-300RV	ctgatgggaccactccat
gBRAF-seq-FW	ttattgactctaagaggaaagatgaa
LHA-FW	tgactggagtgaaggtttg
LHA-RV	catttcctatcagagcaagc
RHA-FW	gtggatggtaagaattgagg
RHA-RV	catgagtggcctgtgattc
LHA-FW-NotI	atacatac-GCGGCCGC-tgactggagtgaaggtttg
LHA-RV-linkA	GCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAG-catttcctatcagagcaagc
RHA-FW -linkB	CGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-gtggatggtaagaattgagg
RHA-RV-NotI	atacatac-GCGGCCGC-catgagtggcctgtgattc
BRAF-Screening-A-FW	agggacatggataaataggcttg
BRAF-Screening-A-Neo-RV	tagggcgcgataacttcgta
BRAF-Screening-B-Neo-FW	ccgaggagcaggactgaata
BRAF-Screening-B-RV	agcaggccagtcaactcct
BRAF-CDS-1727-FW	attgcacgacagactgcaca
BRAF-CDS-2077-RV	tcctcgtcccaccataaaaa
BRAF-CDS-1082-FW	aatcaatttgggcaacgag
BRAF-CDS-1191-RV	caccacgaaatccttggctct
BRAF-42-FW-EcoRI	ggctggaattccccggctctcggttat
BRAF-42-FW-NheI	ggctggctagccccggctctcggttat
BRAF-42-FW-PacI	ggctgtaattaacccccggctctcggttat

BRAF-2388-RV-Xbal	ggctctagactcctgaactctctcactcatttg
BRAF-2388-RV-NotI	ggtgcgccgctcctgaactctctcactcatttg
mVillin-8479-FW	ctggcctaaagctcaccaag
mVillin-8651-FW	ttgtttggttcctctgc
BRAF-CDS-143-RV	cacacctcctccggaatg

9.5 Software

Zur Auswertung und Verarbeitung der experimentellen Daten wurden hauptsächlich die Anwendungen für Tabellenkalukation, Textverarbeitung- und Präsentationen aus den Softwarepaketen Microsoft Office 2003 und LibreOffice 3.4.2, sowie die Bildbearbeitungsprogramme Photoshop (Version 7.0.1) und Gimp (Versionen 2.1 bis 2.6) eingesetzt.

Daneben wurden bei quantitativer PCR und Durchflusszytometrie sowohl Geräte-spezifische Softwareprodukte (realplex 2.0 und Rotor-gene 6.0, bzw. CellQuest Pro 4.0.2 und CFlow Plus 1.0.227.4) als auch Chromas Lite 2.01, Serial Cloner (Versionen 1.2 und 2.1) und Flowing Software (Versionen 1.6 und 2.1) verwendet. Weiter wurden die Online-Applikationen ClustalW2, Primer3, RepeatMasker, NCBI Blast Align2Sequences und der Finnzymes PCR Fidelity Calculator, sowie die Toolbox-Funktionen unter www.test-tube.info benutzt.

9.6 Datenbanken

Genomische Nukleotidsequenzen wurden der EnsEMBL-Datenbank des EMBL entnommen und in Einzelfällen mit den Datensätzen des Genome Browser der University of California, Santa Cruz abgeglichen.

Als Quelle für Transkript- und primäre Proteinsequenzen wurden die Bereiche Nucleotide und Protein der NCBI-Homepage genutzt. Die zugehörigen Informationen über natürliche Variationen und beschriebene Mutationen wurden der UniProt-Datenbank entnommen.

Für Literaturrecherchen standen PubMed (NCBI) und der Online-Katalog der Universitätsbibliothek München zur Verfügung.

10 Verwendete Einheiten

In der Regel wurden für messbare Parameter bevorzugt SI-Einheiten angegeben. In einigen Fällen wurde aufgrund fachspezifischer Konventionen von den Empfehlungen des Internationalen Büros für Maß und Gewicht (BIPM) abgewichen.

Die Massen von Proteinen und Polypeptiden wurden in Kilodalton (kDa) angegeben. Dabei gilt: 1 kDa = 1 000 u (units) und $1 \text{ u} = 1,660\,538\,921 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$.

Stoffmengen wurden in Mol mit $1 \text{ mol} = 6.022\,141\,29 \cdot 10^{23}$ angegeben. Konzentrationen wurden molar mit $1 \text{ M} = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oder als Massenkonzentration $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben.

Die Länge von Oligo- und Polynukleotiden wurde in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Angabe erfolgte unabhängig davon, ob es sich um einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäuren handelt. Die Tatsache, dass die Basen in einzelsträngige RNA oder DNA nicht gepaart vorliegen wurde dabei ignoriert.

Prozentangaben wurden kontextabhängig angegeben. Bei Lösungsbestandteilen steht % für die Masse pro Volumen und Vol-% für den Volumenanteil. Im Zusammenhang mit Zellkultivierung wurde die Konfluenz als prozentuale Abdeckung der Fläche eines repräsentativen Gesichtsfeldes angegeben.

Bei Zentrifugationen wurde die relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) als vielfaches der Erdbeschleunigung mit $1 \text{ RZB} = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ angegeben.

Zur nachvollziehbaren Quantifizierung von Bakterien wurde die Anzahl an koloniebildenden Einheiten CFU (colony-forming units) bestimmt. Dazu wurde ein definiertes Volumen der Bakteriensuspension stufenweise verdünnt und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach etwa 20 Stunden Inkubation wurden die mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien gezählt und entsprechend der Verdünnungsreihe auf die Ursprungskonzentration normalisiert.

11 Rechtlicher Hinweis

Zugunsten einer besseren Lesbarkeit wurden Warenzeichen und Markennamen nicht explizit kenntlich gemacht. Alle Markennamen und eingetragenen Warenzeichen sind Eigentum ihrer rechtmäßigen Besitzer und dienen hier nur der Beschreibung.

12 Abkürzungen

Aufgeführt werden fachspezifische Abkürzungen und Abkürzungen von Eigennamen, soweit diese sprachlich nicht allgemeine Gültigkeit besitzen.

5-FU	5-Fluoruracil
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAVS1	<i>Adeno-associated Virus Site 1</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Akt	<i>v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BGH	<i>Bovine Growth Hormone</i> , Gen für ein Wachstumshormon aus Rindern
BIPM	<i>Bureau International des Poids et Mesures</i>
bla	beta-Lactamase, Resistenzgen gegen Ampicillin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare, Einheit zur Längenangabe von Nukleinsäure-Sequenzen
<i>BRAF/B-Raf</i>	<i>v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>copy</i> -DNA, durch reverse Transkription aus mRNA gewonnene DNA
CDS	<i>Coding Sequence</i> , kodierende Sequenz ohne Introns
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CIMP	CpG-Insel Methylierungsphänotyp
CIMP- <i>high</i>	Phänotyp mit starker Methylierung
CIMP- <i>low</i>	Phänotyp mit schwacher Methylierung
CIMP- <i>negative</i>	CIMP negativ, keine Methylierung der CpG-Inseln
CIN	chromosomale Instabilität
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CYP2C8	<i>Cytochrom P450 family 2 member C8</i>
del	<i>Deleted</i> , durch Knockout deletiertes Allel (in Abbildungen als „-“ dargestellt)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum der Helmholtz Gemeinschaft, Heidelberg
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Natrium-Dextransulfat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , EGF-Rezeptor
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
Erk	<i>Extracellular Regulated-Signal Kinase</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FASTA	Dateiformat der Software FAST-All für Nukleinsäure- und Protein-Sequenzdaten

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , fetales Kälberserum
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
floxed	<i>Flanked by loxP</i> , von loxP-Sequenzen flankiertes Gen
FOLFIRI	Therapieschema aus Folinsäure, 5-Fluoruracil und Irinotecan
FOLFOX	Therapieschema aus Folinsäure, 5-Fluoruracil und Oxaliplatin
FW	<i>Forward</i> , für Oligonukleotid-Primer in Richtung 5'→3'
HA	Homologiearm
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
KRAS/K-Ras	<i>V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LB	Nährmedium nach Luria und Bertani
LHA	Linker Homologiearm
MAPK	MAP-Kinase, Mitogen-Activated Protein Kinase
MCS	<i>Multiple Cloning Site, Polylinker</i>
Mek	<i>Meiosis Specific Protein Kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
MSI-high	hohe Mikrosatelliten-Instabilität
MSI-low	niedrige Mikrosatelliten-Instabilität
MSS	Mikrosatelliten stabil, keine Mikrosatelliten-Instabilität
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC	mTOR-Komplex
NCBI	<i>National Center for Biotechnical Information</i>
onc	<i>oncogene</i> , eine onkogene Mutation tragend
pA	Polyadenylierungssequenz
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i> , histologische Anwendung des Schiffschens Reagenz
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
PGK	Promotor des Phosphoglyceratkinase-Gens aus Hefe (<i>S. cerevisiae</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rep	Replikationsursprung, funktionales Element in Plasmid-DNA
RHA	Rechter Homologiearm
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase, Gruppe von Transmembranrezeptoren

RV	<i>Reverse</i> , für Oligonukleotid-Primer in Richtung 3'→5'
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung, Einheit der Schleuderziffer nach DIN 58970-2
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Electrophoresis</i>
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SOC	Nährmedium, von SOB (<i>Super Optimal Broth</i>) abgeleitet
TAM	Tamoxifen, 4-Hydroxy-Tamoxifen
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Trk	<i>Tropomyosin-Related Kinase</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i> (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF/VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)</i>
Wnt	<i>Wg/Int1 (Wingless/Integration 1) Homolog</i>
wt/WT	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

- 1 Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID e.V.), <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID>. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 2 Becker N, Wahrendorf J: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1998. Fortschreibung im Internet: www.krebsatlas.de
- 3 Wald NJ: *Mortality from lung cancer and coronary heart-disease in relation to changes in smoking habits*. Lancet. 1976 Jan 17;1(7951):136-8.
- 4 Jung EG: *Photocarcinogenesis in the skin*. J Dermatol. 1991 Jan;18(1):1-10.
- 5 Jackman RJ, Mayo CW: *The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon*. Surg Gynecol Obstet. 1951 Sep;93(3):327-30.
- 6 Xavier RJ, Podolsky DK: *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature. 2007 Jul 26;448(7152):427-34.
- 7 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY: *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. J Natl Cancer Inst. 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
- 8 McLeish JA, Thursfield VJ, Giles GG: *Survival from colorectal cancer in Victoria: 10-year follow up of the 1987 management survey*. ANZ J Surg. 2002 May;72(5):352-6.
- 9 National Cancer Intelligence Network Data Briefing, 2009. *Colorectal Cancer Survival by Stage*. Online verfügbar unter: http://www.ncin.org.uk/publications/data_briefings/colorectal_cancer_survival_by_stage.aspx. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 10 Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L: *Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?* Blood. 2000 Sep 1;96(5):1655-69.
- 11 Søndergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, Sazegar H, MacConaill LE, Barretina JG, Kehoe SM, Attar N, von Euw E, Zuckerman JE, Chmielowski B, Comin-Anduix B, Koya RC, Mischel PS, Lo RS, Ribas A: *Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAF^{V600E} mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032*. J Transl Med. 2010 Apr 20;8:39.
- 12 Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N: *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF*. Nature. 2010 Mar 18;464(7287):427-30.
- 13 Stuart D, Aardalen K, Venetsanakos E, Nagel T, Wallroth M, Batt D, Ramurthy S, Poon D, Faure M, Lorenzana E, Salangsang F, Dove J, Garrett E, Aikawa M, Kaplan A, Amiri P, Renhove P: *RAF265 is a potent Raf kinase inhibitor with selective anti-proliferative activity in vitro and in vivo*. AACR Meeting Abstracts. 2008:4876.
- 14 GlaxoSmithKline GSK Clinical Trials: *A Study of GSK2118436 in BRAF Mutant Metastatic Melanoma*. In: ClinicalTrials.gov, Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA). 2000-2012. Verfügbar unter: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01153763>, NLM-Identifizier: NCT01153763. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 15 Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, Figer A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E, Jones D, Dethling J, Colman J, Coward L, MacGregor S: *Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study*. Lancet. 2002 Aug 31;360(9334):671-7.
- 16 Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E: *Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol. 2003 Jan 1;21(1):60-5.
- 17 Hanahan D, Weinberg RA: *The hallmarks of cancer*. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- 18 Hanahan D, Weinberg RA: *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- 19 Lazebnik Y: *What are the hallmarks of cancer?* Nat Rev Cancer. 2010 Apr;10(4):232-3.
- 20 Harris CC: *p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical*

- perspective*. Carcinogenesis. 1996 Jun;17(6):1187-98.
- 21 Aaronson SA, Tronick SR: *The role of oncogenes in human neoplasia*. Important Adv Oncol. 1985:3-15.
 - 22 Weinberg RA: *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell. 1995 May 5;81(3):323-30.
 - 23 Abercrombie M: *Contact inhibition and malignancy*. Nature. 1979 Sep 27;281(5729):259-62.
 - 24 Coussens LM, Werb Z: *Inflammation and cancer*. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
 - 25 Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D: *Infections as a major preventable cause of human cancer*. J Intern Med. 2000 Sep;248(3):171-83.
 - 26 Thiery JP: *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):442-54.
 - 27 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T: *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.
 - 28 Hoffmann FM: *Drosophila abl and genetic redundancy in signal transduction*. Trends Genet. 1991 Nov-Dec;7(11-12):351-5.
 - 29 Weinstein IB: *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer*. Science. 2002 Jul 5;297(5578):63-4.
 - 30 Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B: *Clonal analysis of human colorectal tumors*. Science. 1987 Oct 9;238(4824):193-7.
 - 31 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
 - 32 Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
 - 33 Baba S: *Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer*. World J Surg. 1997 Sep;21(7):678-87.
 - 34 Anthony DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R: *Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells*. Cancer Res. 1996 Mar 15;56(6):1374-81.
 - 35 Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, Mangone L, Francisci S; The EUROCORE Working Group: *Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EUROCORE study*. Int J Cancer. 2011 May 23.
 - 36 Behrens J: *The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis*. Biochem Soc Trans. 2005 Aug;33(Pt 4):672-5.
 - 37 Nusse R: *Wnt signaling in disease and in development*. Cell Res. 2005 Jan;15(1):28-32.
 - 38 Nusse R, Lim X: *The Wnt Homepage*. <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>. Aufgerufen am 12. März 2012.
 - 39 Jass JR: *Colorectal cancer: a multipathway disease*. Crit Rev Oncog. 2006 Dec;12(3-4):273-87.
 - 40 Jass JR: *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. Histopathology. 2007 Jan;50(1):113-30.
 - 41 Okii E, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K: *Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair*. Oncogene. 1999 Mar 25;18(12):2143-7.
 - 42 Scholtka B, Schneider M, Melcher R, Katzenberger T, Friedrich D, Berghof-Jäger K, Scheppach W, Steinberg P: *A gene marker panel covering the Wnt and the Ras-Raf-MEK-MAPK signalling pathways allows to detect gene mutations in 80% of early (UICC I) colon cancer stages in humans*. Cancer Epidemiol. 2009 Aug;33(2):123-9.
 - 43 Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW: *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. Nat Genet. 2006 Jul;38(7):787-93.

- 44 Issa JP: *Colon cancer: it's CIN or CIMP*. Clin Cancer Res. 2008 Oct 1;14(19):5939-40.
- 45 Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE: *Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas*. N Engl J Med. 2004 Dec 30;351(27):2883.
- 46 Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A: *Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR*. Cancer Treat Rev. 2009 May;35(3):262-71.
- 47 Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA: *Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome*. Science. 2006 Mar 3;311(5765):1287-90.
- 48 Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR: *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. Nature. 2007 Mar 8;446(7132):153-8.
- 49 Chen JY, Lin JR, Cimprich KA, Meyer T: *A Two-Dimensional ERK-AKT Signaling Code for an NGF-Triggered Cell-Fate Decision*. Mol Cell. 2011 Dec 28.
- 50 Todd R, Wong DT: *Oncogenes*. Anticancer Res. 1999 Nov-Dec;19(6A):4729-46.
- 51 Rapp UR, Reynolds FH Jr, Stephenson JR: *New mammalian transforming retrovirus: demonstration of a polyprotein gene product*. J Virol. 1983 Mar;45(3):914-24.
- 52 Kozak C, Gunnell MA, Rapp UR: *A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6*. J Virol. 1984 Jan;49(1):297-9.
- 53 Sithanandam G, Kolch W, Duh FM, Rapp UR: *Complete coding sequence of a human B-Raf cDNA and detection of B-Raf protein kinase with isozyme specific antibodies*. Oncogene. 1990 Dec;5(12):1775-80.
- 54 King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS: *The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338*. Nature. 1998 Nov 12;396(6707):180-3.
- 55 Fabian JR, Daar IO, Morrison DK: *Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase*. Mol Cell Biol. 1993 Nov;13(11):7170-9.
- 56 Garnett MJ, Marais R: *Guilty as charged: B-RaF is a human oncogene*. Cancer Cell. 2004 Oct;6(4):313-9.
- 57 Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R: *The role of B-RaF in melanoma*. Cancer Metastasis Rev. 2005 Jan;24(1):165-83.
- 58 Bossemeyer D: *Protein kinases - structure and function*. FEBS Lett. 1995 Aug 1;369(1):57-61.
- 59 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- 60 Zhang BH, Guan KL: *Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601*. EMBO J. 2000 Oct 16;19(20):5429-39.
- 61 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD: *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic*

- colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
- 62 Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A: *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
- 63 Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, Martini M, Cipani T, Marrapese G, Mazzucchelli L, Lamba S, Veronese S, Frattini M, Bardelli A, Siena S: *Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer*. *PLoS One*. 2009 Oct 2;4(10):e7287.
- 64 Rizzo S, Bronte G, Fanale D, Corsini L, Silvestris N, Santini D, Gulotta G, Bazan V, Gebbia N, Fulfaro F, Russo A: *Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?* *Cancer Treat Rev*. 2010 Nov;36 Suppl 3:S56-61.
- 65 Merck KGaA Merck Serono: *Cetuximab Combined With Irinotecan in First-line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer (CRYSTAL)*. In: *ClinicalTrials.gov*, Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA). 2000-2012. Verfügbar unter: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00154102>, NLM-Identifer: NCT00154102. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 66 Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F: *Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status*. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):2011-9.
- 67 Flaherty KT: *Is it good or bad to find a BRAF mutation?* *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1229-30.
- 68 Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Cisar L, Labianca R, Cunningham D, Van Cutsem E, Bosman F: *Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial*. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):466-74.
- 69 Saridaki Z, Papadatos-Pastos D, Tzardi M, Mavroudis D, Bairaktari E, Arvanity H, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J: *BRAF mutations, microsatellite instability status and cyclin D1 expression predict metastatic colorectal patients' outcome*. *Br J Cancer*. 2010 Jun 8;102(12):1762-8.
- 70 Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, Kondo C, Mizota A, Utsunomiya S, Muro K, Yatabe Y: *BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer*. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):856-62.
- 71 Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA: *Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid*. *Pharmacogenetics*. 2001 Oct;11(7):597-607.
- 72 Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P: *Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-Fluorouracil toxicity*. *J Clin Invest*. 1996 Aug 1;98(3):610-5.
- 73 van't Veer LJ, Bernards R: *Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns*. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):564-70.
- 74 Mansour JC, Schwarz RE: *Molecular mechanisms for individualized cancer care*. *J Am Coll Surg*. 2008 Aug;207(2):250-8.
- 75 Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL: *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy*. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
- 76 Zitzmann K, Rüden J, Brand S, Göke B, Lichtl J, Spöttl G, Auernhammer CJ: *Compensatory activation of Akt in*

- response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Lett.* 2010 Sep 1;295(1):100-9.
- 77 Barnier JV, Papin C, Eychène A, Lecoq O, Calothy G: *The mouse B-Raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression.* *J Biol Chem.* 1995 Oct 6;270(40):23381-9.
- 78 Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène A: *Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf.* *J Biol Chem.* 1998 Sep 18;273(38):24939-47.
- 79 Hmitou I, Druillennec S, Valluet A, Peyssonnaud C, Eychène A: *Differential regulation of B-Raf isoforms by phosphorylation and autoinhibitory mechanisms.* *Mol Cell Biol.* 2007 Jan;27(1):31-43.
- 80 Seth R, Crook S, Ibrahim S, Fadhil W, Jackson D, Ilyas M: *Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer.* *Gut.* 2009 Sep;58(9):1234-41.
- 81 Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, Salton M, Dahlman KB, Tadi M, Wargo JA, Flaherty KT, Kelley MC, Misteli T, Chapman PB, Sosman JA, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Rosen N, Solit DB: *RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E).* *Nature.* 2011 Nov 23;480(7377):387-90.
- 82 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.* *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- 83 Kohli M, Rago C, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: *Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses.* *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 2;32(1):e3.
- 84 Manis JP: *Knock out, knock in, knock down - genetically manipulated mice and the Nobel Prize.* *N Engl J Med.* 2007 Dec 13;357(24):2426-9.
- 85 Bretscher A, Weber K: *Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner.* *Cell.* 1980 Jul;20(3):839-47.
- 86 Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL: *Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine.* *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33275-83.
- 87 Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H: *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium.* *Genes Dev.* 2003 Jul 15;17(14):1709-13.
- 88 Westendorf AM, Templin M, Geffers R, Deppenmeier S, Gruber AD, Probst-Kepper M, Hansen W, Liblau RS, Gunzer F, Bruder D, Buer J: *CD4+ T cell mediated intestinal immunity: chronic inflammation versus immune regulation.* *Gut.* 2005 Jan;54(1):60-9.
- 89 Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, Berin C, Unkeless JC, Mayer L, Abreu MT, Lira SA: *Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria.* *Gastroenterology.* 2008 Aug;135(2):529-38.
- 90 Chambers CA: *TKO'ed: lox, stock and barrel.* *Bioessays.* 1994 Dec;16(12):865-8.
- 91 Sauer B: *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system.* *Methods.* 1998 Apr;14(4):381-92.
- 92 Abremski K, Hoess R.J: *Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein.* *Biol Chem.* 1984 Feb 10;259(3):1509-14.
- 93 Imai T, Jiang M, Chambon P, Metzger D: *Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):224-8.
- 94 Meddings J: *The significance of the gut barrier in disease.* *Gut.* 2008 Apr;57(4):438-40.
- 95 Barker N, Clevers H: *Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells.*

- Gastroenterology. 2007 Dec;133(6):1755-60.
- 96 Scoville DH, Sato T, He XC, Li L: *Current view: intestinal stem cells and signaling*. Gastroenterology. 2008 Mar;134(3):849-64.
- 97 Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A: *Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol. 2008 Jan 21;14(3):401-7.
- 98 Halbleib JM, Nelson WJ: *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev. 2006 Dec 1;20(23):3199-214.
- 99 Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, Cruickshank N, Hall C, Elder J, Allan R, Forbes A, Kim YS, Wright NA, Sanders DS: *Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis*. Lab Invest. 1998 Sep;78(9):1155-67.
- 100 Bruewer M, Samarin S, Nusrat A: *Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex*. Ann N Y Acad Sci. 2006 Aug;1072:242-52.
- 101 Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, Fontanari C, Klar J, Kurtz A, Blunk T, Goeferich A: *Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines*. J Gene Med. 2005 Oct;7(10):1287-98.
- 102 Zhang X, Guo C, Chen Y, Shulha HP, Schnetz MP, LaFramboise T, Bartels CF, Markowitz S, Weng Z, Scacheri PC, Wang Z: *Epitope tagging of endogenous proteins for genome-wide ChIP-chip studies*. Nat Methods. 2008 Feb;5(2):163-5.
- 103 Di Nicolantonio F, Arena S, Gallicchio M, Bardelli A: *Isogenic mutant human cells: a new tool for personalized cancer medicine*. Cell Cycle. 2010 Jan 1;9(1):20-1.
- 104 Issaeva I, Cohen AA, Eden E, Cohen-Saidon C, Danon T, Cohen L, Alon U: *Generation of double-labeled reporter cell lines for studying co-dynamics of endogenous proteins in individual human cells*. PLoS One. 2010 Oct 21;5(10):e13524.
- 105 Luo Y, Bolund L, Sørensen CB: *An improved PCR strategy for fast Screening of specific and random integrations in rAAV-mediated gene targeted cell clones*. BMC Res Notes. 2011 Jul 21;4:246.
- 106 Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K: *Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells*. J Cell Biol. 2010 Dec 13;191(6):1141-58.
- 107 Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O: *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc. 2009;4(12):1798-806.
- 108 Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C: *BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells*. Mol Cancer Res. 2008 May;6(5):751-9.
- 109 Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F: *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC Dev Biol. 2001;1:4.
- 110 Soriano P: *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. Nat Genet. 1999 Jan;21(1):70-1.
- 111 Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P: *Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 15;94(8):3789-94.
- 112 Politi K, Kljuic A, Szabolcs M, Fisher P, Ludwig T, Efstratiadis A: *'Designer' tumors in mice*. Oncogene. 2004 Feb 26;23(8):1558-65.
- 113 Yang H, Madison B, Gumucio DL, Teitelbaum DH: *Specific overexpression of IL-7 in the intestinal mucosa: the role in intestinal intraepithelial lymphocyte development*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008

Jun;294(6):G1421-30.

- 114 Barnier JV, Papin C, Eychène A, Lecoq O, Calothy G: *The mouse B-Raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression*. J Biol Chem. 1995 Oct 6;270(40):23381-9.
- 115 Boussadia O, Kutsch S, Hierholzer A, Delmas V, Kemler R: *E-Cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland*. Mech Dev. 2002 Jul;115(1-2):53-62.
- 116 el Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D, Robine S: *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. Genesis. 2004 Jul;39(3):186-93.
- 117 Moolenbeek C, Ruitenbergh EJ: *The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine*. Lab Anim. 1981 Jan;15(1):57-9.
- 118 Loessner H, Endmann A, Leschner S, Westphal K, Rohde M, Miloud T, Hämmerling G, Neuhaus K, Weiss S: *Remote control of tumour-targeted Salmonella enterica serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression in vivo*. Cell Microbiol. 2007 Jun;9(6):1529-37.
- 119 Gallmeier E, persönliche Kommunikation.
- 120 Agilent Technologies Inc.: *AAV Helper-Free System Instruction Manual*. Revision B, 2010, Seite 30, Abbildung 8.
- 121 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- 122 Mercer KE, Pritchard CA: *Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target*. Biochim Biophys Acta. 2003 Jun 5;1653(1):25-40.
- 123 Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project: *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf*. Cell. 2004 Mar 19;116(6):855-67.
- 124 Kriegl L, Neumann J, Vieth M, Greten FR, Reu S, Jung A, Kirchner T: *Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer*. Mod Pathol. 2011 Jul;24(7):1015-22.
- 125 Uegaki K, Kanamori Y, Kigawa J, Kawaguchi W, Kaneko R, Naniwa J, Takahashi M, Shimada M, Oishi T, Itamochi H, Terakawa N: *PTEN is involved in the signal transduction pathway of contact inhibition in endometrial cells*. Cell Tissue Res. 2006 Mar;323(3):523-8.
- 126 Rusnak DW, Alligood KJ, Mullin RJ, Spehar GM, Arenas-Elliott C, Martin AM, Degenhardt Y, Rudolph SK, Haws TF Jr, Hudson-Curtis BL, Gilmer TM: *Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1) and HER2 (ErbB2) protein expression levels and response to lapatinib (Tykerb, GW572016) in an expanded panel of human normal and tumour cell lines*. Cell Prolif. 2007 Aug;40(4):580-94.
- 127 Jhaver M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM: *PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab*. Cancer Res. 2008 Mar 15;68(6):1953-61.
- 128 Schneider MR, Dahlhoff M, Horst D, Hirschi B, Trülsch K, Müller-Höcker J, Vogelmann R, Allgäuer M, Gerhard M, Steininger S, Wolf E, Kolligs FT: *A key role for E-Cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation*. PLoS One. 2010 Dec 14;5(12):e14325.
- 129 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. Nature. 2002 Aug 29;418(6901):934.
- 130 Kim JS, Lee C, Foxworth A, Waldman T: *B-Raf is dispensable for K-Ras-mediated oncogenesis in human cancer*

cells. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):1932-7.

- 131 Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, Martini M, Cipani T, Marrapese G, Mazzucchelli L, Lamba S, Veronese S, Frattini M, Bardelli A, Siena S: *Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer.* *PLoS One.* 2009 Oct 2;4(10):e7287.
- 132 Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R: *PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers.* *PLoS One.* 2011;6(7):e22769.
- 133 Weinstein IB, Begemann M, Zhou P, Han EK, Sgambato A, Doki Y, Arber N, Ciaparrone M, Yamamoto H: *Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy.* *Clin Cancer Res.* 1997 Dec;3(12 Pt 2):2696-702.
- 134 Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA: *Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation.* *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5198-202.
- 135 Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K, Kawakami Y: *Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference.* *Oncogene.* 2004 Aug 12;23(36):6031-9.
- 136 Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N: *BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition.* *Nature.* 2006 Jan 19;439(7074):358-62.
- 137 Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ, Marais R: *B-RAF is a therapeutic target in melanoma.* *Oncogene.* 2004 Aug 19;23(37):6292-8.
- 138 Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP: *Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors.* *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2412-21.
- 139 Mendoza MC, Er EE, Blenis J: *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation.* *Trends Biochem Sci.* 2011 Jun;36(6):320-8.
- 140 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.* *Eur J Biochem.* 2000 Sep;267(17):5421-6.
- 141 Johnson GR, Ostertag W, Nicola NA: *Proliferation in vivo and in vitro of haemopoietic progenitor cells induced by AF-1, a new ras-containing retrovirus.* *Haematol Blood Transfus.* 1985;29:376-9.
- 142 Schicher N, Paulitschke V, Swoboda A, Kunstfeld R, Loewe R, Pilarski P, Pehamberger H, Hoeller C: *Erlotinib and bevacizumab have synergistic activity against melanoma.* *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3495-502.
- 143 Bottos A, Martini M, Di Nicolantonio F, Comunanza V, Maione F, Minassi A, Appendino G, Bussolino F, Bardelli A: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 7;109(6):E353-9. *Targeting oncogenic serine/threonine-protein kinase BRAF in cancer cells inhibits angiogenesis and abrogates hypoxia.*
- 144 Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW: *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593-602.
- 145 Campisi J: *Suppressing cancer: the importance of being senescent.* *Science.* 2005 Aug 5;309(5736):886-7.
- 146 Mooi WJ, Peeper DS: *Oncogene-induced cell senescence - halting on the road to cancer.* *N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):1037-46.
- 147 Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS: *BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.* *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):720-4.

- 148 Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, Larue L, Pritchard C, Marais R: *Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice*. *Cancer Cell*. 2009 Apr 7;15(4):294-303.
- 149 Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR: *Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7*. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):363-74.
- 150 Scurr LL, Pupo GM, Becker TM, Lai K, Schrama D, Haferkamp S, Irvine M, Scolyer RA, Mann GJ, Becker JC, Kefford RF, Rizos H: *IGFBP7 is not required for B-RAF-induced melanocyte senescence*. *Cell*. 2010 May 14;141(4):717-27.
- 151 Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR: *Role for IGFBP7 in senescence induction by BRAF*. *Cell*. 2010 May 28;141(5):746-7.
- 152 Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F, Mijatovic S: *Resistance to TRAIL and how to surmount it*. *Immunol Res*. 2012 Mar 11.
- 153 Baccarini M: *An old kinase on a new path: Raf and apoptosis*. *Cell Death Differ*. 2002 Aug;9(8):783-5.
- 154 Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W: *Raf family kinases: old dogs have learned new tricks*. *Genes Cancer*. 2011 Mar;2(3):232-60.
- 155 Sánchez-Hernández I, Baquero P, Calleros L, Chiloeches A: *Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism*. *Cancer Lett*. 2012 Jan 28;314(2):244-55.
- 156 Toker A, Newton AC: *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8271-4.
- 157 Wellcome Trust Sanger Institute, Cancer Genome Project: *Cancer Cell Line Project*. In: Core Cell Line Viewer. Verfügbar unter http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/core_line_viewer?action=sample&id=909698. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 158 Wang GL, Iakova P, Wilde M, Awad S, Timchenko NA: *Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity*. *Genes Dev*. 2004 Apr 15;18(8):912-25.
- 159 Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS: *Combinatorial treatments that overcome PDGFRβ-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition*. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5067-74.
- 160 Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, Wood E, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson AR, Ribas A, Palma MD, Nathanson KL, Koomen JM, Messina JL, Smalley KS: *PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression*. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2750-60. Epub 2011 Feb 11.
- 161 Oikonomou E, Koc M, Sourkova V, Andera L, Pintzas A: *Selective BRAFV600E inhibitor PLX4720, requires TRAIL assistance to overcome oncogenic PIK3CA resistance*. *PLoS One*. 2011;6(6):e21632.
- 162 Plexxikon, Roche Pharma AG: *Safety Study of PLX4032 in Patients With Solid Tumors*. In: ClinicalTrials.gov, Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA). 2000-2012. Verfügbar unter: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00405587>, NLM-Identifizier: NCT00405587. Aufgerufen am 12. März 2012.
- 163 Ikehara N, Semba S, Sakashita M, Aoyama N, Kasuga M, Yokozaki H: *BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms*. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):943-50.
- 164 Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, Nguyen TK, Flaherty KT, Letrero R, Van Belle P, Elder DE, Wang Y, Nathanson KL, Herlyn M: *CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations*. *Oncogene*. 2009 Jan 8;28(1):85-94.
- 165 Mercer K, Giblett S, Green S, Lloyd D, DaRocha Dias S, Plumb M, Marais R, Pritchard C: *Expression of endogenous oncogenic V600E-B-Raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts*. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11493-500.

- 166 Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY: *Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. Science.* 2001 Dec 7;294(5549):2155-8.
- 167 Baker DG: *Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr;11(2):231-66.
- 168 Castiglione F, Diaferia M, Morace F, Labianca O, Meucci C, Cuomo A, Panarese A, Romano M, Sorrentini I, D'Onofrio C, Caporaso N, Rispo A: *Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the "hygiene hypothesis": A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. J Crohns Colitis.* 2012 Apr;6(3):324-9.
- 169 Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, Cruickshank N, Hall C, Elder J, Allan R, Forbes A, Kim YS, Wright NA, Sanders DS: *Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. Lab Invest.* 1998 Sep;78(9):1155-67.
- 170 Inoue T, Murano M, Yoda Y, Kuramoto T, Kakimoto K, Ishida K, Kawakami K, Abe Y, Morita E, Murano N, Tokioka S, Maemura K, Umegaki E, Higuchi K: *R-etodolac induces E-cadherin and suppresses colitis-related mouse colon tumorigenesis. Oncol Rep.* 2010 Dec;24(6):1487-92.
- 171 Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, Griffiths AM, Ngan BY, Lan H, Xu W, Silverberg MS, Rotin D: *Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. Gut.* 2009 Aug;58(8):1121-7.
- 172 Hiltwein FN, persönliche Kommunikation.