

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
LEHRSTUHL FÜR HUMANBIOLOGIE

Die Rolle von onkogenem Beta-Catenin  
bei der Entstehung von Kolorektalkarzinomen:  
Analyse genetisch definierter Mausmodelle

Franziska Rohde

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 28.02.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.05.2008 angenommen.

**Für meinen lieben Mann**

**It's not strange, it's novel**

(Prof. Dr. Georg Häcker)

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	<b>Wnt-Signalwege</b>	<b>7</b>
1.1.1	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg	7
1.1.1.1	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in nicht stimulierten Zellen	7
1.1.1.2	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Wnt-stimulierten Zellen	10
1.1.2	Die „nicht-kanonischen“ Wnt-Signalwege	11
1.1.3	Verbindungen zwischen den Wnt-Signalwegen	12
1.1.4	Die Zielgene der Wnt-Signalwege	12
1.2	<b>Der Wnt-Signalweg im Darmepithel</b>	<b>15</b>
1.3	<b>Der Wnt-Signalweg und die Krebsentstehung</b>	<b>17</b>
1.3.1	Die Molekulargenetik der Tumorentstehung	18
1.3.2	Das Kolorektalkarzinom als Beispiel für solide Tumoren	19
1.3.3	Mausmodelle für Kolorektalkarzinome	23
1.4	<b>Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg</b>	<b>27</b>
1.4.1	Mechanismus der PI3-Kinase/Akt-Aktivierung	27
1.4.2	Die Rolle von aktivierter Akt	29
1.4.3	Negative Regulatoren des PI3K/Akt-Signalweges	30
1.4.4	PI3K/Akt-Kaskade und die Entstehung von Krebs	30
1.4.5	Mausmodelle für den PI3K/Akt-Signalweg	31
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>33</b>
2.1.1	Chemikalien	33
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	35
2.1.3	Geräte	35
2.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	36
2.1.5	Versuchstiere	40
2.1.6	Antikörper	41
2.1.6.1	Antikörper für Immunoblot	41
2.1.6.2	Antikörper für Immunpräzipitation	41
2.1.6.3	Reagenzien für Immunfluoreszenz	41
2.1.6.4	Antikörper für Immunhistochemie	42
2.1.7	Primer	42
2.1.7.1	Primer für die Genotypisierung	42
2.1.7.2	Primer für die RT-PCR	43
2.1.7.3	Primer für die LOH-PCR und Sequenzierung	44
2.2	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	45

---

2.2.1.1	Isolierung von DNA für die Genotypisierung	45
2.2.1.2	Isolierung von RNA	45
2.2.1.3	Isolierung von genomischer DNA und RNA	45
2.2.1.4	Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	46
2.2.1.5	cDNA Synthese (Reverse Transkription)	46
2.2.1.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.1.7	Real-Time PCR	47
2.2.1.8	Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel	48
2.2.1.9	Auftrennung von PCR-Produkten im Acrylamidgel	48
2.2.2	Biochemische Methoden	48
2.2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten	48
2.2.2.2	Immunpräzipitation	49
2.2.2.3	Zellkernfraktionierung	49
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.2.5	Western-Blot (Immunoblot)	50
2.2.2.6	Spezifischer Proteinnachweis mittels Immundetektion	50
2.2.3	Immunhistochemie und Immuncytochemie	51
2.2.3.1	Kryoschnitte	51
2.2.3.2	Paraffinschnitte	51
2.2.3.3	Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE)	51
2.2.3.4	Immunfluoreszenz	52
2.2.3.5	Immunhistochemie	52
2.2.3.6	Fixierung und Färbung des Maudarms	52
2.2.3.7	X-Gal Färbung	53
2.2.4	Primärkultur	53
2.2.5	Zellkultur	53
2.2.6	Tamoxifen Injektion	54
2.2.7	Radioaktive Bestrahlung	54
2.2.8	Statistische Auswertung	54
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Projekt I: Einfluss von onkogenem <math>\beta</math>-Catenin auf die Tumorentstehung</b>	<b>55</b>
3.1.1	A33 <sup>DN-Bcat</sup> -Maus	55
3.1.1.1	Transgenes $\beta$ -Catenin wird spezifisch im Darm von Bcat-Mäusen exprimiert	56
3.1.1.2	Intrazelluläre Lokalisierung von DN-Bcat	58
3.1.1.3	Aktivierung von Wnt-Zielgenen durch DN-Bcat	58
3.1.1.4	Verstärkte Expression von Panethzellmarkern im Dünndarm von Bcat-Mäusen	60
3.1.1.5	DN-Bcat induziert die Tumorgenese	61
3.1.1.6	Verschiedene Wnt-Zielgene sind in Tumoren von Bcat-Mäusen dereguliert	62
3.1.1.7	Osteopontin als Wnt-Zielgen	64
3.1.1.8	Zusätzliche Mutationen	65
3.1.2	Generierung neuer kombinierter Mausmodelle für kolorektale Karzinome	65

---

3.1.2.1	Unterschiedlich starke Tumorentstehung und Tumorentstehung in den verschiedenen Mausmodellen	66
3.1.2.2	Wnt-Zielgene werden in den Mausmodellen unterschiedlich stark exprimiert	68
3.1.2.3	Verstärkte Cox2 Expression in ApcBcat- und RasApc-Tumoren	70
3.1.2.4	Verstärkte Blutgefäßbildung in den Tumoren aus ApcBcat-Mäusen	71
<b>3.2</b>	<b>Projekt II: Einfluss von aktivierter Akt auf die Tumorentstehung</b>	<b>73</b>
3.2.1	Die tmaAkt/Z-Maus	73
3.2.1.1	Erfolgreiche Rekombination des transgenen Akt-Lokus durch die pVillinCre-Rekombinase	74
3.2.1.2	Das transgene tmaAkt wird im Darm exprimiert und ist durch Tamoxifen aktivierbar	76
3.2.2	Induktion von Stress in CreAkt-Mäusen	77
3.2.3	Generierung und Analyse von CreAktApc-Mäusen	79
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von onkogenem <math>\beta</math>-Catenin auf die Tumorentstehung</b>	<b>81</b>
4.1.1	Die A33 <sup>DN-Bcat</sup> -Maus als Modell für eine schwache Wnt-Aktivierung	81
4.1.2	Unterschiedlich starke Tumorentstehung und Tumorentstehung in kombinierten Mausmodellen für die kolorektale Karzinogenese	87
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von aktivierter Akt auf die Tumorentstehung</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>95</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>5.2</b>	<b>Summary</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>119</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>7.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>7.3</b>	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
<b>7.4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>126</b>

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Wnt-Signalwege**

Die Entwicklung und Homöostase von multizellulären Organismen hängt von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Zelltod ab. Die Wnt-Signalwege spielen für die Koordination dieser verschiedenen zellulären Antworten eine wichtige Rolle. Wnts sind sekretierte Glykoproteine, die von verschiedenen Zelltypen produziert werden (Cadigan und Nusse, 1997). Derzeit sind 19 humane Wnt-Proteine bekannt, die eine Größe von ca. 40 kDa haben (Miller, 2002). Sie sind sehr cysteinreich und an einem konservierten Cysteinrest palmitoyliert. Diese Modifikation ist wichtig für ihre Aktivität (Willert et al., 2003). Die sekretierten Proteine assoziieren mit der extrazellulären Matrix und können fest an der Zelloberfläche binden (Bradley und Brown, 1990; Miller, 2002). Durch die Bindung an Rezeptoren der Frizzled-Familie sowie an die Ko-Rezeptoren LRP5/6 (LRP: LDL Receptor Related Protein) kommt es zur Weiterleitung des Wnt-Signals. Wnt-Proteine können drei Signalwege aktivieren. Dabei werden der kanonische oder Wnt/ $\beta$ -Catenin-, der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - und der Wnt/planare Zellpolarität-Signalweg unterschieden. Welcher dieser Signalwege aktiviert wird, hängt davon ab, welches der 19 Wnts mit einem der 10 Frizzled-Rezeptoren interagiert und welche Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle stattfinden.

Eine Deregulierung der Wnt-Signalwege führt zu vielen verschiedenen Krankheitsbildern, wie etwa Entwicklungsstörungen (Tetra Amelia), neuronalen Defekten (Alzheimer) und insbesondere verschiedenen Formen von Krebs.

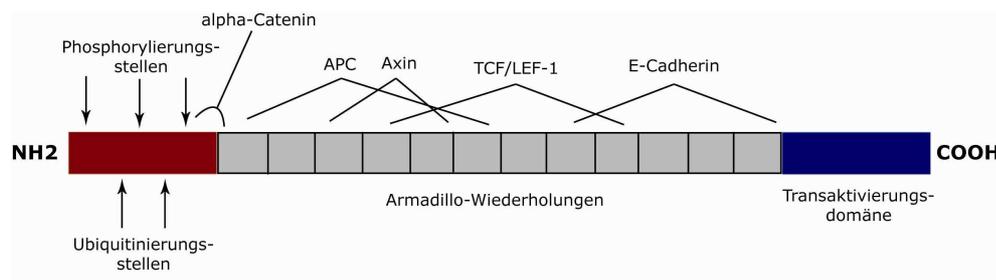
#### **1.1.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung durch die Aktivierung der Transkription bestimmter Gene (Wnt-Zielgene). Während der Embryogenese ist dieser Signalweg an der Ausbildung der dorso-ventralen Achse beteiligt, und seine fehlerhafte Regulation führt zu Defekten in der Entwicklung des Embryos. In adulten Organismen spielen Wnt-Signale eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung oder Selbsterneuerung von Geweben, wie etwa bei der regelmäßigen Erneuerung des Darmepithels. Kommt es dabei zu einer Fehlregulation, kann dies oft zur Tumorentstehung in den betroffenen Organen führen.

##### **1.1.1.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in nicht stimulierten Zellen**

Die zentrale Komponente dieser Kaskade ist  $\beta$ -Catenin, dessen Stabilität durch Wnt reguliert wird. Beta-Catenin ist das Säugetier-Homolog des *Drosophila*-Proteins Armadillo und wurde ursprünglich als Bindungspartner von E-Cadherin beschrieben. An Zell-Zell-Kontakten verbindet  $\beta$ -Catenin das Adhäsionsprotein E-Cadherin mit alpha-Catenin und somit mit dem Aktin-Zytoskelett (Nagafuchi und Takeichi, 1989; Ozawa et al., 1989; McCrea et al., 1991; Cowin, 1994; Hülsken et al., 1994).

Beta-Catenin enthält in seinem zentralen Bereich zwölf Wiederholungen von 42 Aminosäureresten, die sogenannten Armadillo-Wiederholungen (Pfeifer et al. 1994). Sie vermitteln die Interaktion des Proteins mit Cadherinen, APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axin und TCF (T-Cell Factor) (Hülken et al., 1994; Huber et al. 1997; von Kries et al., 2000). Amino-terminal befinden sich vier stark konservierte Phosphorylierungsstellen: Serin 33, Serin 37, Threonin 41 und Serin 45, die für die post-translationale Regulation des Proteins essentiell sind. Der Karboxy-Terminus stellt eine Transaktivierungsdomäne dar (Abb.1.1).

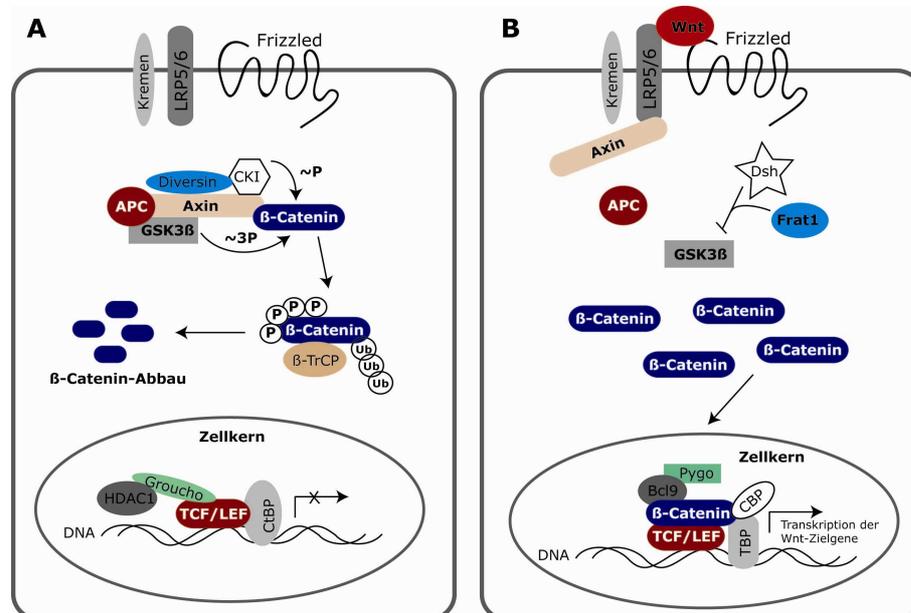


#### Abb.1.1: Die Primärstruktur von $\beta$ -Catenin

Die zentrale Domäne (grau) besteht aus 12 Armadillo-Wiederholungen, welche die Interaktion mit den Proteinen alpha-Catenin, APC, Axin, TCF und E-Cadherin vermittelt. Am Amino-Terminus (rot) befinden sich die Phosphorylierungsstellen und die Ubiquitinierungsstellen für die post-translationale Regulation des Proteins. Der Karboxy-Terminus (blau) besteht aus einer Transaktivierungsdomäne.

Wenn kein Wnt-Signal vorhanden ist, wird zytosolisches  $\beta$ -Catenin im sogenannten Zerstörungskomplex an den vier konservierten Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Dieser Komplex besteht aus den Proteinen APC, Axin (oder seinem Homolog Axin2/Conductin), der Serin/Threonin-Kinase GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) und CKI $\alpha/\epsilon$  (Casein Kinase I  $\alpha$  oder  $\epsilon$ ), Diversin und dem F-Box-Protein  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transducin Repeat Containing Protein), einem Element der E3 Ubiquitin Ligase. Das Tumorsuppressorprotein Axin dient dabei als Gerüst und ermöglicht die Ausbildung dieses Komplexes. Axin und sein Homolog Conductin enthalten eine amino-terminale RGS-Domäne (Regulator of G-protein Signaling), an die APC bindet. Außerdem hat Axin Bindungsstellen für Dishevelled (Dsh), Diversin, CKI, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin (Lustig und Behrens, 2003). APC, ebenfalls ein Tumorsuppressor, bindet über seine zentrale Domäne, welche drei 15- und sieben 20-Aminosäure-Wiederholungen enthält, an  $\beta$ -Catenin, wobei die letzten Wiederholungen für den Abbau von  $\beta$ -Catenin essentiell sind. Innerhalb der 20-Aminosäure-Wiederholungen sind drei Bindungsstellen für Axin vorhanden, die sogenannten SAMP-Motive (SAMP: Serin Alanin Methionin Prolin) (Polakis, 1997; Fearnhead et al., 2001; Fodde 2003). APC hat im Wnt-Signalweg die Funktion,  $\beta$ -Catenin zu binden und es zum Zerstörungskomplex im Zytoplasma zu transportieren. Dabei vermittelt APC auch den Transport von  $\beta$ -Catenin aus dem Zellkern ins Zytoplasma und reprimiert so die durch  $\beta$ -Catenin aktivierten Wnt-Zielgene (Neufeld et al., 2000).

In Abwesenheit von Wnt wird  $\beta$ -Catenin in einem Zwei-Schritt-Mechanismus phosphoryliert (Abb.1.2A). Zunächst phosphoryliert CKI $\epsilon$  (oder CKI $\alpha$ ), das direkt über Diversin am Zerstörungskomplex bindet, den Serinrest 45 und ermöglicht so die Phosphorylierung der anderen drei Reste durch GSK3 $\beta$  in der Reihenfolge Threonin 41 -> Serin 37 -> Serin 33 (Schwarz-Ramond et al., 2002; Amit et al., 2002; Yanagawa et al., 2002). Die Phosphorylierung der letzten beiden Aminosäurereste löst die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin durch die Bindung von  $\beta$ -TrCP aus, was zum Abbau von  $\beta$ -Catenin im Proteasom führt (Hart et al., 1999; Kitagawa et al., 1999). GSK3 $\beta$  phosphoryliert neben  $\beta$ -Catenin auch Axin und APC, wobei die Phosphorylierung von Axin wichtig für dessen Stabilität ist (Rubinfeld et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Aufgrund des Abbaus von  $\beta$ -Catenin im Proteasom in Abwesenheit von Wnt-Signalen kommt es zu einer niedrigen zytosolischen und nukleären Konzentration von  $\beta$ -Catenin, was zur Inhibition der Expression der Wnt-induzierten Gene im Zellkern führt.



**Abb.1.2: Vereinfachte schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges**  
**(A)** nicht stimulierte Zelle. **(B)** Zelle nach Aktivierung durch das Wnt-Signal. Details siehe Text.  
 P: Phosphorylierung, Ub: Ubiquitinierung.

In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin binden Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (TCF: T-Cell Factor, LEF: Lymphoid Enhancer Factor) an die Promotorbereiche der Wnt-Zielgene. Die TCF/LEF-Faktoren (TCF-1, TCF-3, TCF-4 und LEF-1) enthalten eine HMG-Box (HMG: High Mobility Group), über die sie als Monomere an die DNA binden. Das TCF/LEF-Erkennungsmotiv entspricht der Sequenz 5' (A/T) (A/T) C A A (A/T) G 3', wobei Basen unmittelbar vor und/oder nach der Sequenz auch konserviert sein können (Eastman und Grosschedl, 1999; Roose und Clevers, 1999). Die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an die DNA verursacht eine starke Krümmung der DNA, wodurch weitere regulatorische Proteine binden können (Giese et al., 1992; Dooijes et al., 1993;

Giese et al., 1995). Anders als LEF-1 können TCFs alleine die Transkription der Wnt-Zielgene nicht aktivieren, sondern benötigen  $\beta$ -Catenin als Ko-Faktor. Wenn kein Wnt-Signal vorhanden ist, wirkt TCF/LEF als Repressor zusammen mit Ko-Repressoren wie CtBP (Carboxy-terminal Binding Protein) und TLE (Transducin-like Enhancer of split) oder dessen Homolog in *Drosophila* Groucho (Roose et al., 1998; Cavallo et al., 1998; Brannon et al., 1999). Groucho bindet auch die Histon-Deacetylase 1 (HDAC1), was vermutlich zu einer kompakteren Chromatinstruktur und folglich zur Transkriptionsrepression führt (Chen et al., 1999).

### 1.1.1.2 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Wnt-stimulierten Zellen

Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges beinhaltet die gleichzeitige Bindung von Wnt an einen Rezeptor der Frizzled-Familie (Bhanot et al., 1996; Wang et al., 1996) und an den Ko-Rezeptor LRP5/6 (Wehrli et al., 2000; Tamai et al., 2000). Frizzled-Rezeptoren sind Proteine mit 7-Transmembrandomänen, die eine amino-terminale cysteinreiche Domäne, an die Wnt bindet, und ein PDZ-bindendes Motiv im Karboxy-Terminus besitzen (Bhanot et al., 1996). LRP5 und LRP6 sind Transmembranproteine, die in ihrem extrazellulären Teil Bindungsstellen für Wnt und Dickkopf-1 (Dkk-1) und im zytosolischen Teil eine Axin-bindende Region haben (Mao, B. et al., 2001; Mao, J. et al., 2001). Nach Bindung von Wnt an beide Rezeptoren wird LRP5/6 phosphoryliert, wodurch eine Bindungsstelle für Axin geschaffen wird. Folglich wird Axin zur Plasmamembran rekrutiert und bindet dort an den zytoplasmatischen Teil von LRP5/6 (Mao, J. et al., 2001; Tamai et al., 2004). Dies führt zur Destabilisierung des Zerstörungskomplexes.

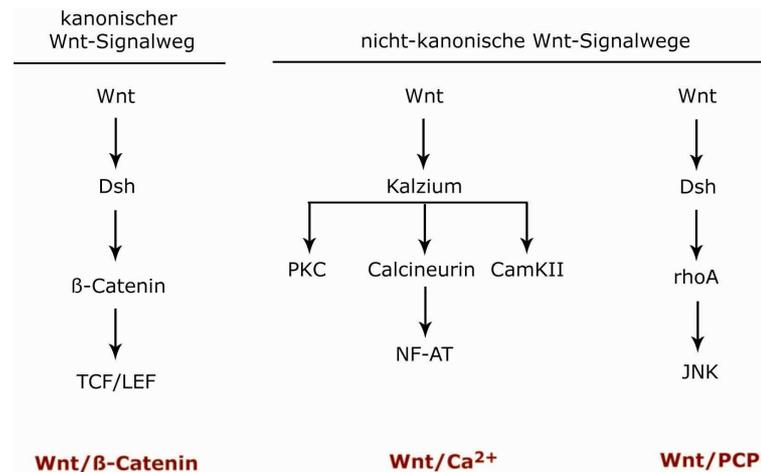
Zusätzlich bewirkt das Wnt-Signal die Hyperphosphorylierung des Adapterproteins Dishevelled (Dsh), was dadurch die Aktivität der GSK3 $\beta$  inhibiert (Yanagawa et al., 1995). Es wird vermutet, dass ein quaternärer Komplex aus Axin, Dsh, GSK3 $\beta$  und Frat1 (Frequently rearranged in T-cell lymphoma 1) existiert (Giles et al., 2003). Dabei bindet Dsh und GSK3 $\beta$  an Axin und Frat1, wobei Dsh und GSK3 $\beta$  nicht direkt miteinander interagieren (Li et al., 1999; Fraser et al., 2002). Wnt bewirkt die Translokation von Dsh zur Plasmamembran und dessen Phosphorylierung, was möglicherweise die Frat1-vermittelte Dissoziation der GSK3 $\beta$  von Axin zur Folge hat. Der Zerfall des Zerstörungskomplexes führt zur Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, welches dadurch seine Affinität zu Axin, das ebenfalls dephosphoryliert wird, und zu APC verringert. Das Protein dissoziiert von seinen Bindungspartnern und akkumuliert im Zytoplasma. Nicht phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird vorzugsweise in den Zellkern transportiert (Staal et al., 2002). Dort bindet  $\beta$ -Catenin an TCF/LEF, und die Interaktion dieses Komplexes mit weiteren Aktivatoren führt zur Transkription der Wnt-Zielgene. Der Kontakt zum basalen Transkriptionsapparat erfolgt durch die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit TBP (TATA Binding Protein) oder indirekt über Pontin52 (Bauer et al., 1998).  $\beta$ -Catenin bindet auch die Histon-Acetylase p300/CBP, wodurch es zur Acetylierung von Histonen, und somit zur Lockerung der lokalen Chromatinstruktur kommt (Takemaru und Moon, 2000; Hecht et al., 2000). Weiterhin interagiert  $\beta$ -Catenin mit Brg-1 (Brahma-related gene 1), einer Komponente des SWI/SNF-Komplexes, welche die Reorganisation des Chromatins erleichtert (Barker et al., 2001). Die Proteine Bcl9/Legless und Pygopus sind ebenso positive Regulatoren der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkription (Thompson et al., 2002; Kramps et al., 2002). Dabei hat Bcl9/Legless

die Aufgabe, Pygopus in den Zellkern zu  $\beta$ -Catenin zu bringen. Pygopus seinerseits erleichtert den Zugang von TCF oder  $\beta$ -Catenin zum Chromatin (Kramps et al., 2002). Der Komplex aus  $\beta$ -Catenin, TCF/LEF und den erwähnten Aktivatoren induziert schließlich die Transkription der Wnt-Zielgene (Abb.1.2B). Die Aktivität der Wnt-Proteine kann durch verschiedene sekretierte Proteine extrazellulär moduliert werden. So binden FRPs (Frizzled Related Proteins), WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor 1) und Cerberus direkt an die Wnt-Moleküle und verhindern deren Bindung an den Frizzled-Rezeptor (Moon et al., 1997; Hsieh et al., 1999; Piccolo et al., 1999). Die Dickkopf-Proteine (Dkk) binden dagegen an den extrazellulären Teil von LRP5/6 und blockieren somit die Signalweiterleitung durch Wnt (Glinka et al., 1998; Fedi et al., 1999; Nusse, 2001; Bafico et al., 2001; Mao B. et al., 2001). Dkk-1 bindet auch das membranverankerte Protein Kremen, was zur Internalisierung des ternären Komplexes aus Kremen, Dkk-1 und LRP5/6 führt (Mao et al., 2002). Demnach reguliert Dkk-1 die Verfügbarkeit von LRP5/6 auf der Zelloberfläche. Ohne LRP5/6 kann Wnt den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht aktivieren.

### 1.1.2 Die „nicht-kanonischen“ Wnt-Signalwege

Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg wird durch Wnt-5a und Wnt-11 aktiviert. Dabei kann diese Signalkaskade durch die Bindung der Wnt-Liganden nur an bestimmte Frizzled-Rezeptoren (Frizzled-2,-3,-4 und -6) erfolgen (Kuhl et al., 2000). Die Bindung von Wnt-5a an einen dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen. Die dadurch freigesetzten  $\beta/\gamma$ -Untereinheiten aktivieren die Phospholipase C $\beta$ , die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) umsetzt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). IP<sub>3</sub> bewirkt den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteine wie die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CamKII) und die Proteinphosphatase Calcineurin aktiviert werden. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF-AT, der dann im Zellkern akkumuliert und die Genexpression reguliert (Miller et al., 1999; Kuhl et al., 2000; Wang und Malbon, 2004). Wnt-5a kann auch (über Frizzled-2) Gat und somit die Phosphodiesterase (PDE) aktivieren, woraus ein verringerter cGMP-Spiegel resultiert. Dadurch können cGMP-abhängige Ionenkanäle, die Guanylylcyclase, PDEs und/oder die Proteinkinase G reguliert werden (Wang und Malbon, 2003; Wang und Malbon, 2004) (Abb. 1.3).

Der Wnt/planare Zellpolarität- oder PCP-Signalweg (PCP: Planar Cell Polarity) kontrolliert die asymmetrische Reorganisation des Zytoskelettes (Tada et al., 2002; Tree et al., 2002; Weston und Davis, 2002). In dieser Signalkaskade sind Wnt-5a, Wnt-11 und Frizzled-7 involviert. Wnt-11 bindet mit Hilfe des Proteoglykans Knypek an den Rezeptor, wodurch Dishevelled (Dsh) zur Membran transportiert wird. Der Signalweg zweigt auf der Ebene von Dsh von der kanonischen Kaskade ab. Dsh führt zur Aktivierung der JNK-Kaskade (JNK: Jun amino-terminal Kinase), woraus eine veränderte Genexpression resultiert. Alternativ interagiert das Protein Daam mit Dsh und der kleinen GTPase RhoA und bewirkt so die Ausbildung eines Dsh-RhoA-Komplexes. Aktives RhoA (RhoA-GTP) führt zur Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase und schließlich zur Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes. (Abb. 1.3).



**Abb.1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Wnt-Signalwege**

Übersicht über den kanonischen und die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege.

### 1.1.3 Verbindungen zwischen den Wnt-Signalwegen

Nicht nur die Kombination aus den verschiedenen Wnt-Liganden und Frizzled-Rezeptoren bestimmt, welcher der drei Wnt-Signalwege aktiviert wird. Zahlreiche weitere Proteine können mit Komponenten dieser Kaskade interagieren, wodurch ein Signalweg aktiviert und ein anderer inhibiert wird. Die Casein Kinase I phosphoryliert Dsh und vermittelt die Aktivierung des kanonischen und die Inhibition des PCP-Signalweges (Peters et al., 1999; McKay et al., 2001). Andererseits inhibieren Nkd (Naked cuticle) und Strabismus (Stbm oder van Gogh) die Funktion von Dsh im Wnt/ $\beta$ -Catenin- und aktivieren den PCP-Signalweg (Yan et al., 2001; Park und Moon, 2002). In *Xenopus* inhibiert die durch den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg aktivierte PKC den kanonischen Signalweg durch Phosphorylierung von Dsh (Kuhl et al., 2001). Auch CamKII inhibiert die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade (Kuhl et al., 2001). Sowohl der kanonische als auch der PCP-Signalweg werden durch das Dsh-assoziierte Protein Dapper negativ reguliert (Cheyette et al., 2002). Die mit Dsh interagierende Kinase PAR-1 wird durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg stimuliert und hemmt den PCP-Signalweg (Sun et al., 2001). Somit entscheiden auch die Wechselwirkungen von Dsh mit seinen Bindungspartnern, welcher Signalweg aktiviert und welcher reprimiert wird.

### 1.1.4 Die Zielgene der Wnt-Signalwege

Die Identifizierung der Gene, deren Expression durch Wnts kontrolliert wird, war von großer Bedeutung, da die Fehlregulation der Wnt-Kaskade zu zahlreichen Krankheitsbildern, insbesondere zur Krebsentstehung, führt. Heute ist eine Vielzahl von Wnt-Zielgenen bekannt, die eine Rolle bei der Embryonalentwicklung und Tumorentstehung haben. Eine detaillierte und vollständige Liste ist unter der Internetadresse <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> zu finden. Die meisten dieser Gene sind direkte Zielgene, d.h. sie besitzen in ihren Promotor-Regionen eine oder

mehrere TCF/LEF-Bindungsstellen und werden durch den TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplex reguliert, wie etwa *c-Myc*, *TCF-1*, *JUN*, *FRA-1* (Tab.1.1). *CCND1* (CyclinD1) wurde auch als direkt durch TCF/ $\beta$ -Catenin reguliertes Gen identifiziert (Tetsu und McCormick, 1999). Dies wird allerdings kontrovers diskutiert, da dominant negatives TCF-4 die Expression dieses Gens nicht inhibiert (Van de Wetering et al., 2002; Wilding et al., 2002; Sansom et al., 2005). Für die Regulation mancher Gene sind noch weitere Motive in den Promotoren, bzw. weitere Transkriptionsfaktoren notwendig, wie das CREB-Motiv und das CREB-Protein (CREB: cAMP Response Element Binding Protein), das PEA3-Motiv und PEA3 (Polyoma virus Enhancer A binding protein 3), das AP-1-Motiv, sowie p300/CBP (Tab.1.1). Eine Reihe von Wnt-Zielgenen, wie etwa *mBTEB2*, wird unabhängig von  $\beta$ -Catenin bzw. TCF/LEF reguliert (Tab.1.1). Andere Gene werden durch die Synergiewirkung von Wnt und Retinsäure induziert (Szeto et al., 2001; Tice et al., 2002).

Gen	$\beta$ -Catenin/TCF-Einfluss	Weitere Faktoren	Referenz
<i>c-Myc</i>	+/+	-	He et al., 1998
<i>CCND1</i>	+/+	-	Tetsu und McCormick, 1999
<i>TCF-1</i>	+/+	-	Roose et al., 1999
<i>JUN, FRA-1</i>	+/+	-	Mann et al., 1999
<i>WISP-1</i>	+/-	CREB	Pennica et al. 1998, Xu et al., 2000
<i>MMP7</i>	+/+	AP-1, PEA3	Brabletz et al., 1999
<i>IL8</i>	+/+	p300/CBP	Levy et al., 2002
<i>mBTEB2</i>	-/-	PKC	Ziemer et al., 2001
<i>Ephrin B1</i>	Wnt-1	RS	Tice et al., 2002

### 3. Tab.1.1: Beispiele für Wnt induzierte Zielgene und ihre Regulation

PEA3: Polyoma virus Enhancer A binding protein 3, CREB: cAMP response element-binding protein, PKC: Proteinkinase C, RS: Retinsäure. Modifiziert nach Ziegler, 2004.

Die Wnt-Zielgene kodieren Proteine mit sehr unterschiedlichen Funktionen, wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine und Transkriptionsfaktoren (Tab.1.2). Eine beachtliche Zahl der durch Wnt regulierten Gene ist an der Regulation der Zellproliferation, des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt. Nicht zuletzt aktiviert Wnt auch Gene, die Komponenten des Wnt-Signalweges selbst kodieren. Durch die Induktion von Axin2,  $\beta$ -TrCP, sFRP und Groucho werden negative Rückkopplungsschleifen geschaffen, welche den Signalweg blockieren. Andererseits kann die Wnt-Aktivierung durch die Expression von Frizzled-Rezeptoren und p300/CBP verstärkt werden.

Prozess	Protein	Funktion	Referenz
Zellproliferation Zellzyklus	c-myc	TF	He et al., 1998
	CyclinD1	CDK-Aktivator	Tetsu und McCormick, 1999
	c-Jun, Fra-1	TF	Mann et al., 1999
	Id2	TF	Rockman et al., 2001
	P21 <sup>CIP/WAF1</sup>	CDK-Aktivator	van de Weterin et al., 2002
	WISP-1	WF	Pennica et al. 1998, Xu et al., 2000
Zelladhäsion	E-Cadherin	Zelladhäsionsprotein	Jamora et al., 2003
	CD44	Zelladhäsionsprotein	Wielenga et al., 1999
Apoptose	Cox-2	Enzym	Howe et al., 1999
	Caspase-3, -7	Enzym	Chen et al., 2003
	Survivin	IAP	Zhang, T. et al., 2001a
Gewebe- Reorganisation	MMP-3	MMP	Prieve und Moon, 2003
	MMP-7	MMP	Brabletz et al., 1999
Tumorinvasion	MMP-26	MMP	Marchenko et al., 2002
Metastasierung	Cox-2	Enzym	Howe et al., 1999
Angiogenese	VEGF	WF	Zhang, X. et al., 2001b
Feedback- Mechanismen im Wnt- Signalweg	TCF-1	TF	Roose et al., 1999
	LEF-1	TF	Hovanes et al., 2001
	Frizzled	Rezeptor	Willert et al., 2002; Tice et al., 2002
	CBP/p300	Histon-Acetylase	Willert et al., 2002
	Axin	Strukturprotein	Yan et al., 2001a
	$\beta$ -TrCP	E3-Ligase	Spiegelman et al., 2000

#### 4. Tab.1.2: Produkte einiger Wnt-regulierter Gene und deren Funktion

CDK: Cyclin Dependent Kinase, IAP: Inhibitor der Apoptose, MMP: Matrix-Metalloproteinase; TF: Transkriptionsfaktor, WF: Wachstumsfaktor. Modifiziert nach Ziegler, 2004.

Die ersten Wnt-Zielgene, die identifiziert wurden, waren das Proto-Onkogen Cmyc und CyclinD1, ein Aktivator der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu und McCormick, 1999). Durch die Expression beider Gene stimuliert das Wnt-Signal die Zellzyklusprogression. Die Aktivierung von Cmyc durch TCF/ $\beta$ -Catenin führt zur Repression der p21<sup>CIP</sup>-Transkription, dies erfolgt durch die Bindung von Cmyc an den Promotor des p21<sup>CIP/WAF1</sup>-Lokus. Da p21<sup>CIP/WAF1</sup> die Aktivität mehrerer CDKs blockieren kann, ermöglicht der TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplex eine Zellzyklusblockade durch die reduzierte Expression von p21<sup>CIP/WAF1</sup>. TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplexe können ebenso direkt die Aktivität der CDKs stimulieren und fördern somit die Zellzyklusprogression durch die verstärkte Expression von CyclinD1 (Lustig und Behrens, 2003). Interessanterweise kommt verstärkt nukleäres und damit aktives  $\beta$ -Catenin an der invasiven Front von Tumoren vor, was darauf schließen lässt, dass Wnt-Signale auch Zielgene regulieren, die in Tumorinvasion und Tumorprogression involviert sind. Dementsprechend konnten mehrere Proteasen, welche die extrazelluläre Matrix abbauen, als Wnt-Gene identifiziert werden, wie MMP7 (Matrilysin) und MMP-26 (Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; Marchenko et al., 2002).

MMP7 hat Einfluss auf die Tumorprogression, und die Akkumulation von nukleärem  $\beta$ -Catenin zusammen mit einer erhöhten MMP7 Expression korreliert mit einer schlechten Prognose bei Darmkrebs (Ougolkov et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsprotein CD44 bereits in ACF (Aberrant crypt foci: vermutliche Tumovorläuferstadien) stark überexprimiert wird, während CD44 in TCF-4 Knockout-Mäusen nicht mehr exprimiert wird (Wielenga et al., 1999).

Zwei Zielgene des Wnt-Signalweges, der nukleäre Hormon-Rezeptor PPAR $\delta$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\delta$ ) und die Cyclooxygenase 2 (Cox2), sind von besonderem Interesse, da sie mit der Entstehung von Kolorektalkarzinomen in Verbindung gebracht werden. Durch chemopräventive, nicht steroidale entzündungshemmende Medikamente (NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), wie Acetylsalicylsäure und Sulindac, werden diese Enzyme gehemmt (Vane und Botting, 1996; He et al., 1999). Cox2 produziert Eikosanoide aus Arachidonsäure, die an PPAR $\delta$ s binden und so die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Promotoren in Verbindung mit Retinolsäure-Rezeptoren stimulieren. PPAR $\delta$  wird während der frühen Karzinogenese durch die Bindung des TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplexes an vier TCF-Bindestellen verstärkt exprimiert (He et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Cox2 ein Wnt-Zielgen ist, da es durch die Induktion von stabilisiertem  $\beta$ -Catenin durch Wnt-1 in einer murinen Brustzelllinie exprimiert wird (Howe et al., 1999). Andererseits scheint  $\beta$ -Catenin die Transkription von Cox2 auch indirekt durch die Erhöhung der Expression der PEA3-Familie von Transkriptionsfaktoren, die potentielle transkriptionelle Aktivatoren für Cox2 sind, zu stimulieren (Howe et al., 2001).

Die meisten der heute beschriebenen Zielgene werden durch Wnt bzw. durch einen aktivierten Wnt-Signalweg induziert. Die Mechanismen der Aktivierung der Genexpression durch Wnt sind viel besser verstanden, als die der Repression von Genen. Für die Hemmung der Genexpression durch Wnt ist derzeit kein einheitlicher Mechanismus bekannt. Zu den bereits beschriebenen Genen, deren Transkription durch einen aktiven Wnt-Signalweg inhibiert wird, gehören p21<sup>CIP/WAF1</sup>, Periostin/Osf2, MCP-3 (Monocyte chemoattractant protein 3) und EphrinB1, sowie viele noch nicht analysierte Gene, die im Rahmen von DNA-Mikroarray-Analysen identifiziert wurden (Van de Wetering et al., 2002).

## 1.2 Der Wnt-Signalweg im Darmepithel

Der Wnt-Signalweg kontrolliert das Schicksal der Zellen während der Embryonalentwicklung. Außerdem ist er ein entscheidender Regulator der Homöostase von adultem, sich selbst-erneuerndem Gewebe. In diesen Gewebetypen ist die Deregulation der Wnt-Kaskade stark mit der Tumorentstehung assoziiert. Das Darmepithel ist eines der am besten verstandenen Beispiele für die Rolle von Wnt bei der Homöostase der Gewebe-Selbsterneuerung und der malignen Transformation.

Der Darm hat die Funktion, die mit der Nahrung aufgenommenen Nährstoffe zu absorbieren, zu verdauen und nicht verwertbare Stoffe zu entsorgen. Im Dünndarm (bestehend aus Duodenum, Jejunum und Ileum) wird die verdaute Nahrung den Enzymen von Pankreas und Galle ausgesetzt,

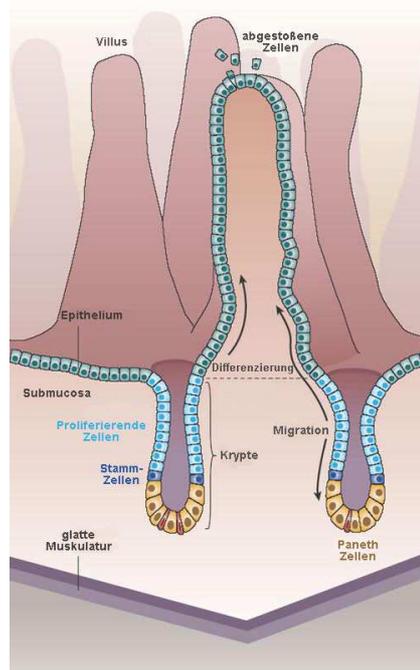
wodurch die Nährstoffe in ihre einzelnen Moleküle zerlegt werden. Weiterhin wird im Dünndarm der größte Anteil an Wasser, Elektrolyten (Natrium, Chlorid, Kalium) und essentiellen organischen Bestandteilen (Glukose, Aminosäuren, Fettsäuren) absorbiert. Der Dickdarm (Kolon) formt den Darminhalt durch weiteres Entziehen von Wasser und Elektrolyten und durch die Zugabe von Bakterien und Schleim.

Der Darm ist aus vier Schichten aufgebaut (von außen nach innen): eine dünne Schicht lockeres Bindegewebe (Lamina submucosa), eine dicke Schicht glatte Muskulatur (Lamina muscularis mucosae), welche die Beweglichkeit des Darms gewährleistet, und eine weitere Schicht von Bindegewebe, die Blut- und Lymphgefäße enthält (Lamina propria). Diese Gefäße versorgen die innerste Schicht, das einschichtige Darmepithel (Lamina epithelialis), das direkt an das Darmlumen grenzt und für die Nährstoffaufnahme zuständig ist.

Verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen sind im Darmepithel vorhanden. Die Enterozyten (im Dünndarm) bzw. die Kolonozyten (im Dickdarm) sind die Zellen, die den größten Teil der Darmschleimhaut ausmachen. Sie absorbieren die Nährstoffe aus dem Darmlumen und transportieren sie zu den Gefäßen und den darunterliegenden Schichten. Diese Zellen sind stark polarisierte Epithelzellen, die viele Mikrovilli an ihrer apikalen Oberfläche aufweisen, stark ausgeprägte Zell-Zell-Verbindungen und ein komplexes Muster an exprimierten Integrinen entlang der Krypt-Villus-Achse besitzen (Hermiston et al., 1994; Brittan und Wright, 2004). Becherzellen liegen zwischen den Kolonozyten und sekretieren Schleim, der für die Bewegung und effektive Diffusion des Darminhaltes nötig ist, aber auch Schutz vor mechanischen und chemischen Schäden gibt (Paulus et al., 1993). Enteroendokrine Zellen setzen Hormone frei, um die Sekretion von Verdauungsenzymen und Galle von Pankreas und Leber in den Darm zu regulieren. Panethzellen findet man vorrangig im Dünndarm (Brittan und Wright, 2004), wo sie eine Vielzahl von antimikrobiellen Proteinen und Peptiden sekretieren und somit einen Beitrag zur mukosalen Immunität leisten (Ayabe et al., 2000).

Die Darmschleimhaut des Dünndarms besteht aus vielen Invaginationen, bekannt als Lieberkühn-Krypten, und fingerartigen Ausstülpungen, den sogenannten Villi, die zur Vergrößerung der Oberfläche dienen. Im Dickdarm werden keine Villi ausgebildet, dafür sind die Krypten stärker ausgeprägt. Im kompletten Darm wird das Darmepithel konstant erneuert. Aus den Stammzellen, die sich vermutlich in der Nähe des Krypten-Bodens befinden, entstehen Zellen, die sich 5-7 Mal teilen, bevor sie sich zu den verschiedenen Zelltypen differenzieren (Potten und Loeffler, 1987; Hermiston et al., 1994; Brittan und Wright, 2004). Während und nach der Differenzierung wandern Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrine Zellen aktiv zur Spitze der Villi bzw. zum Rand der Kolon-Krypten, wo sie vermutlich apoptotisch werden und aus der Monozellschicht herausgeschoben werden. Im Gegensatz dazu wandern Panethzellen in die entgegengesetzte Richtung und nisten sich im Boden der Krypten ein (Abb.1.4).

Der Darm ist neben dem Magen das am stärksten chemisch und mechanisch beanspruchte Gewebe eines Organismus. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die Zellen (außer den Stammzellen) nur eine begrenzte Lebensdauer haben und die Darmschleimhaut alle 3-5 Tage erneuert wird (Potten und Loeffler, 1987).



**Abb.1.4: Aufbau des menschlichen Dünndarms (Schema)**

Potentielle Stammzellen verbleiben direkt oberhalb der Panethzellen im unteren Teil der Krypte. Die proliferierenden Vorläuferzellen besetzen den oberen Teil der Krypte. Die ausdifferenzierten Zellen wandern zum Villus, wo sie nach 3-5 Tagen abgestoßen werden, um Platz für neue Zellen zu machen. Modifiziert nach Reya und Clevers, 2005.

Im normalen Darm werden die Prozesse der Proliferation, Migration und Differenzierung streng kontrolliert, wobei der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle übernimmt. Die Wnt-Aktivität folgt einem Krypt-Villus-Gradienten, wobei sie in den Krypten am stärksten ausgeprägt ist. Der Wnt-Signalweg ist wichtig für die Differenzierung der Darmzellen, insbesondere für die Differenzierung der Panethzellen. Die Störung dieser Homöostase führt zur Tumorbildung. Zunächst entsteht ein Polyp, eine Zellmasse, die aus der Darmwand herausragt. Diese Polypen sind hyperplastisch, d.h. die Zellen zeigen normale Morphologie, sind somit gutartig, und führen normalerweise nicht zum Kolorektalkarzinom. Im Gegensatz dazu sind die adenomatösen Polypen dysplastisch: Die Zellen haben eine anormale intra- und interzelluläre Organisation. Adenome können zu bösartigen Karzinomen heranwachsen, die in der Lage sind, in die benachbarten Gewebe, sowie über die Blut- und Lymphgefäße in entfernte Organe einzudringen (Metastasierung).

### 1.3 Der Wnt-Signalweg und die Krebsentstehung

Krebs stellt keine einzelne Krankheit dar, sondern ist eine Bezeichnung für viele verschiedene Krankheitsformen. Dabei handelt es sich um eine genetische Erkrankung, die auf einem unkontrollierten Wachstum bestimmter Zellen beruht. Krebs ist heute die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den westlichen Ländern und die

dritthäufigste unter den Erwachsenen in den Entwicklungsländern. In Deutschland tritt Lungenkrebs bei Männern am häufigsten auf, gefolgt von Darm- und Prostatakrebs; bei Frauen stellt Brustkrebs die häufigste Todesursache vor Darm- und Lungenkrebs dar (Quelle: Krebs in Deutschland, 2006).

Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem die normale Kontrolle der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Zell-Zell-Interaktionen schrittweise verloren geht (Hanahan und Weinberg, 2000). Abgesehen von den vererbten Formen beruht die Entstehung der meisten Tumore auf somatischen Mutationen. Dabei ist die Mehrheit der Tumore vermutlich monoklonal, das heißt, sie gehen aus einer einzelnen Zelle durch Anhäufung mehrerer genetischer und epigenetischer Veränderungen durch Vermehrung und klonale Selektion hervor. Zunächst entsteht dadurch ein gutartiger Tumor, in dem die Zellen noch gut differenziert sind und die Gewebeorganisation nicht beeinträchtigt ist. Im folgendem Prozess der Tumorprogression entsteht durch zusätzliche genetische Veränderungen ein bösartiger (maligner) Tumor, in dem die Zellen wenig differenziert sind und die Fähigkeit erlangt haben, in die benachbarten Gewebe einzudringen und schließlich in entfernten Organen zu metastasieren. Sechs Veränderungen in der Physiologie der Zelle definieren den malignen Phänotyp (Hanahan und Weinberg, 2000): Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Resistenz gegenüber der Apoptose, unbegrenztes Vermehrungspotential, anhaltende Angiogenese, sowie Gewebeinvasion und Metastasierung.

### **1.3.1 Die Molekulargenetik der Tumorentstehung**

Die genetischen Veränderungen, die zur Tumorinitiation und zur Tumorprogression führen, können als relativ kleine Sequenzveränderungen in der DNA, sowie als chromosomale Abweichungen auftreten. Die Sequenzveränderungen betreffen grundsätzlich zwei Klassen von Genen: die Proto-Onkogene und die Tumorsuppressorgene. Proto-Onkogene kodieren für Proteine, welche die Zellproliferation oder die Progression durch den Zellzyklus stimulieren. Sie werden durch Amplifikation des Genlokus, chromosomale Translokation oder Punktmutationen in Onkogene überführt, das heißt zu aktivierten Formen (gain of function), die zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen führen. Die Mutationen in den Proto-Onkogenen sind dominant, das bedeutet, die Mutation in einem der beiden Allele ist für die Aktivierung des Proto-Onkogens ausreichend. Zu den heute mehr als 100 bekannten Proto-Onkoproteinen gehören Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, Wnt-1), deren Rezeptoren (z.B. EGF-Rezeptoren), Proteine der Signaltransduktion (z.B. Ras-Proteine, Src-Kinase) sowie Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Jun, c-Fos, c-Myc).

Als Tumorsuppressorgene fasst man dagegen Gene zusammen, die eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum haben, und durch einen Funktionsverlust (loss of function) beider Allele an der Tumorgenese beteiligt sind. Die Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen sind rezessiv, das heißt, es kommt erst zu einem anormalen Phänotyp, wenn beide Allele inaktiviert sind (Knudson, 1987). Diesen Prozess bezeichnet man als „Verlust der Heterozygotie“ (LOH: Loss of heterozygosity), der durch fehlerhafte Chromosomen- bzw. Chromatidenteilung während der Zellteilung, mitotische Rekombination, Punktmutation oder durch eine Deletion entsteht. Falls die

erste Mutation durch die Keimbahn vererbt wurde, haben Individuen, die solche Mutationen tragen, oft eine Prädisposition für die Tumorentstehung (Beispiel: FAP-Syndrom mit Mutation im *APC* Gen). Ein alternativer Mechanismus, der die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens bewirken kann, stellt die epigenetische Modifikation dar. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Promotoren verschiedener Tumorsuppressorgene oft in Tumoren methyliert sind, aber in entsprechenden gesunden Geweben frei von Methylierung sind (Gaudet et al., 2003; Feinberg, 2004). Die Methylierung der DNA betrifft 5'-CG-3'-Dinukleotide (CpG), die in den Promotorbereichen der Gene lokalisiert sind. Die Methylierung ist an der Regulation der Genexpression und Chromosomenkondensation beteiligt (Bird, 1992).

Heute sind ca. 30 Tumorsuppressorgene mit unterschiedlichen Funktionen bekannt, so etwa *APC*, *PTEN*, *SASH1*, *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>*. Eines der am besten studierten Tumorsuppressorgene ist *p53*, das in 50% aller Krebszellen mutiert ist. *p53*, welches entweder zur Blockade des Zellzyklus oder zur Induktion der Apoptose führen kann, ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität spielt und deshalb als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane, 1992; Vogelstein et al., 2000).

Neben den klassischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen existiert eine Vielzahl von weiteren „Tumorgen“, die als Modulatoren der Tumorentstehung fungieren, oder als diagnostische und prognostische Tumormarker eine wichtige Rolle in der klinischen Praxis spielen.

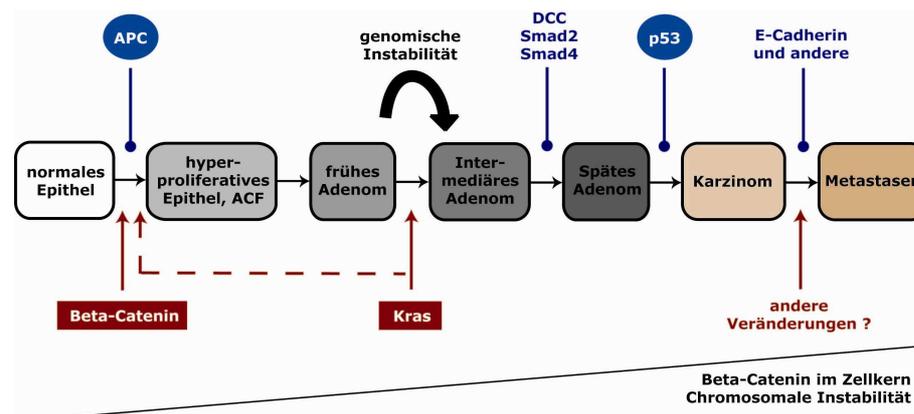
Die chromosomalen Aberrationen führen zu Aneuploidien – Abweichungen vom normalen diploiden Chromosomensatz. Die Veränderungen können sowohl die Chromosomenzahl als auch die Struktur der Chromosomen betreffen und führen zur chromosomalen Instabilität (CIN). Genetische Instabilität innerhalb der Zelle kann auch auf der Nukleotidsequenz-Ebene (MIN, Mikrosatelliten Instabilität) entstehen. In diesem Fall ist der Chromosomensatz der Tumorzellen meist diploid.

### **1.3.2 Das Kolorektalkarzinom als Beispiel für solide Tumoren**

Das Kolorektalkarzinom ist in Deutschland und anderen Ländern Europas die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache (Schmiegel et al., 2000). Mehr als 50% der Bevölkerung entwickeln ab dem 70. Lebensjahr einen benignen Darmtumor, der sich in 10% der Fälle bösartig entwickelt (Kinzler und Vogelstein, 1996). Erbliche Prädispositionen verursachen 5-10% der kolorektalen Karzinome. Unter den vererbbaaren Formen sind die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) und das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polypose (HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) am häufigsten vertreten. Das FAP-Syndrom resultiert aus der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC*, während das HNPCC-Syndrom durch Defekte in den „Reparatur-Mutations-Genen“ entsteht (z.B. *MSH1* und *MCH1*) und zu MIN-Tumoren führt. Neben den genetischen Faktoren stellen Umwelteinflüsse, insbesondere die Ernährung, wichtige Risikofaktoren für die kolorektale Karzinogenese dar.

Kolonkarzinome stellen als molekulargenetisch und histopathologisch gut untersuchtem Tumortyp ein Modell für solide Tumore dar. Die Progression vom normalen Epithel bis hin zum malignen Karzinom verläuft nach dem so genannten „Adenom-Karzinom“ Modell entlang einer vereinfacht linear dargestellten Sequenz über verschiedene Stadien, denen spezifische genetische

Veränderungen zugeordnet werden können (Fearon und Vogelstein, 1990; Vogelstein und Kinzler, 1993) (Abb.1.5). Man geht heute allerdings eher davon aus, dass mehrere parallel verlaufende molekulargenetische Wege zur Tumorgenese führen können („many roads lead to colon cancer“, Alcock et al., 2003). Aufgrund von Modellrechnungen schätzt man, dass 5-10 Mutationen akkumulieren, bevor aus einer normalen Darmepithelzelle eine maligne Tumorzelle entsteht (Kinzler und Vogelstein, 1996).



#### Abb.1.5: Modell der kolorektalen Karzinogenese

Die Initiation und Progression der Tumorentstehung vom normalen Epithel bis hin zum Karzinom und der Ausbildung von Metastasen erfolgt durch viele genetische Veränderungen, wie dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (blau) und der Aktivierung von Onkogenen (rot) (Details siehe Text). Neben der Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern ist die erhöhte chromosomale Instabilität ein wichtiges Merkmal von Darmkrebs. Modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990.

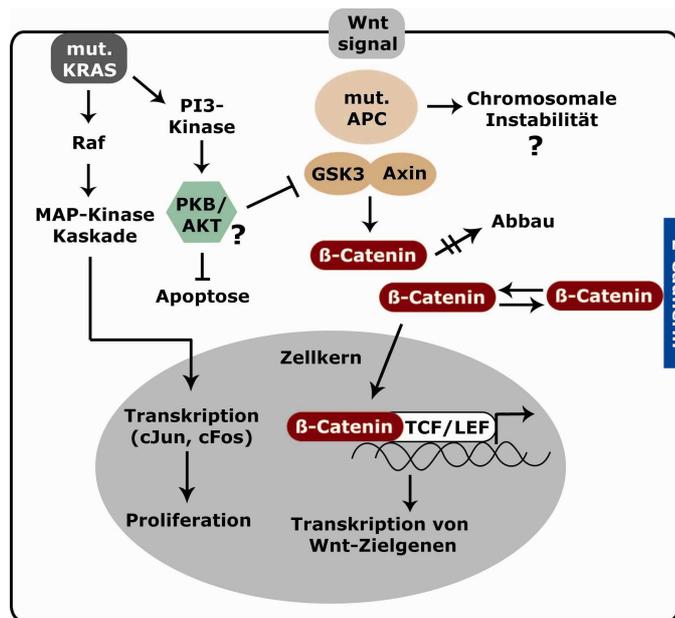
Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* auf dem Chromosom 5q21 kommen in über 80% der kolorektalen Tumore vor (Smith et al., 1993; Kinzler und Vogelstein, 1996) und repräsentieren das früheste genetische Ereignis bei der kolorektalen Tumorinitiation (Powell et al., 1992; Fodde und Smits, 2001). Tatsächlich findet man *APC* Mutationen schon in den frühesten beobachtbaren Tumor-Vorstadien, den so genannten „aberranten Krypten“ (ACF: Aberrant Crypt Foci) sowohl beim Menschen als auch beim Mausmodell (Luongo et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die hauptsächliche Tumorsuppressor-Aktivität von *APC* auf seine Fähigkeit zurückzuführen ist, die intrazellulären Level von  $\beta$ -Catenin innerhalb des Wnt-Signalweges zu regulieren (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Smits et al., 1999) (Abb.1.5; Abb.1.6). Daneben weist *APC* jedoch noch andere, Wnt-unabhängige Funktionen auf, so etwa die Bindung an Mikrotubuli, das Zytoskelettprotein EB1 oder das Protein ASEF, das zu Rac-Aktivierung führt (Kawasaki et al., 2003).

Alternativ können Mutationen im  $\beta$ -Catenin Gen (*CTNNB1*) die Tumorentstehung initiieren, was in 10% der kolorektalen Tumore vorkommt (Abb.1.5; Abb.1.6). Die konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges aufgrund von *APC* oder  $\beta$ -Catenin Mutationen initiiert die kolorektale Karzinogenese durch Deregulation der Expression vieler Zielgene, die eine Rolle bei der Zellproliferation,

Zellmigration, Zelldifferenzierung und Apoptose spielen (Batlle et al., 2002; Kielmann et al., 2002; van de Wetering et al., 2002).

Des Weiteren können auch andere Komponenten des Wnt-Signalweges, wie Axin-1 und Conductin (Axin-2) im Kolonkarzinom mutiert sein (Sparks et al., 1998; Satoh et al., 2000; Clevers, 2000). Die Aktivierung des *KRAS* Onkogens stellt einen zweiten Schritt in der Evolution des Darmtumors dar (Abb.1.5). Das Proto-Onkogen *KRAS* kodiert ein 21 kDa großes Protein, das Guanin-Nukleotide bindet (GTPase) und an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. In 50% aller Kolorektalkarzinome, aber auch in einer großen Anzahl früherer Tumorstadien finden sich aktivierende Mutationen in *KRAS* (Bos et al., 1987, Fearon und Vogelstein, 1990). In der häufigsten Punktmutation *Kras*<sup>V12G</sup> kann das GTP nicht mehr hydrolysiert werden und Ras bleibt dauerhaft in der aktivierten Konformation. Dadurch kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges (Downward, 1997; Campell et al. 1998; Zuber et al., 2000), was zur Zellproliferation führt, und zur Inhibition der Apoptose durch die Aktivierung der Proteinkinase Akt (Kim und Lance, 1997) (Abb.1.6). In dysplastischen ACF aus dem Kolon, die als früheste Stadien der Tumorentwicklung betrachtet werden, wurden in 60% aller Fälle Mutationen in *KRAS* gefunden, während APC oder  $\beta$ -Catenin unverändert waren (Takayama et al., 2001). Darüber hinaus konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass aktiviertes *Kras* in Abwesenheit von Mutationen des *Apc* Gens zur Entstehung von Darmtumoren führen kann (Janssen et al., 2002). Diese Resultate lassen darauf schließen, dass es beim sporadisch auftretenden Kolorektalkarzinom, im Gegensatz zum FAP-Syndrom, einen alternativen Weg der Tumorentstehung gibt, der von in frühen Stadien auftretenden *KRAS* Mutationen abhängt. Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *APC* und *p53* treten in diesem alternativen Modell erst später auf und tragen zur Progression bei.

Der Verlust einer Kopie des Chromosoms 18q erfolgt in 73% der kolorektalen Tumore und ist mit dem Übergang zum späten Adenom verbunden. Tumorsuppressorgene wie *DCC* (Deleted in Colon Cancer), *SMAD2* und *SMAD4* sind auf diesem Chromosom lokalisiert und wahrscheinlich an der Tumorprogression beteiligt (Vogelstein et al., 1988; Heldin et al., 1997). Die Umwandlung eines adenomatösen Polypen in ein Karzinom korreliert zu 75% mit der Inaktivierung von *p53* durch Mutationen oder einen Verlust des Chromosoms 17q (Ohue et al., 1994). Weitere genetische Veränderungen ermöglichen schließlich die Gewebeinvasion und die Metastasierung des Tumors. Neben der Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion stellt die Instabilität des zellulären Genoms eine charakteristische Eigenschaft von Darmkrebszellen dar. Die genetische Instabilität kann sich als Mikrosatelliten-Instabilität (MIN) oder als chromosomale Instabilität (CIN) äußern. Die erste Gruppe, die auch als MIN-Tumoren bezeichnet wird, stellt einen kleineren Teil aller Kolorektalkarzinome (15-20%) dar und wird vermutlich durch Störungen in den zellulären DNA-Reparaturenzymen verursacht, während die Krebszellen diploid bleiben. Den größeren Anteil, nämlich 80% aller Kolorektalkarzinome, umfassen die so genannten CIN-Tumore. Die chromosomale Instabilität äußert sich in numerischen und strukturellen Chromosomendefekten, die zur Aneuploidie führen. CIN-Tumore weisen eine hohe Frequenz an Mutationen in den *Kras*- und *APC*-abhängigen Signalkaskaden auf; daneben treten Störungen in Zellzyklusgenen auf (Rimkus et al., 2007). Neue Studien lassen darauf schließen, dass eine Dysfunktion des *APC* Gens nicht nur eine Störung des Wnt-Signalweges nach sich zieht, sondern auch zur fehlerhaften Trennung von Chromosomen während der Mitose führt (Abal et al., 2007, Aoki et al., 2007).



**Abb.1.6: Die veränderte Signaltransduktion im Kolorektalkarzinom**

*KRAS* ist in 50% aller kolorektalen Tumore mutiert. Dieses Onkogen aktiviert die Transkription über die MAP-Kinasen-Kaskade und unterdrückt die Apoptose durch die Aktivierung der Proteinkinase Akt. Weiterhin kommt es häufig zur Aktivierung des Wnt-Signalweges durch eine Mutation im *APC* Gen (80%) oder durch onkogenes  $\beta$ -Catenin (10%). Dadurch wird  $\beta$ -Catenin nicht mehr im Proteasom abgebaut, es reichert sich im Zytoplasma an, gelangt in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription verschiedener Wnt-Zielgene. Ein Teil des  $\beta$ -Catenins in der Zelle bindet an E-Cadherin an der Zellmembran, wo es als Adhäsionsprotein E-Cadherin mit dem Zytoskelett an Zell-Zell-Kontakten verbindet. APC hat auch Wnt-unabhängige Funktionen. Es bindet an Mikrotubuli und spielt eine Rolle bei der Teilung der Chromosomen während der Mitose. Daher wird mutiertes *APC* im Kolonkarzinom auch mit der Entstehung von chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht.

Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren ist das Verständnis der molekularen Ursachen der Tumorentstehung im Darmepithel nach wie vor bruchstückhaft, und schlägt sich nur unzureichend in Form von verbesserten Diagnose- und Therapieformen in der klinischen Praxis nieder. So gehört etwa die Entstehung von Fernmetastasen nach wie vor zu den weitgehend unverstandenen Prozessen mit schwerwiegender klinischer Bedeutung. Nicht zuletzt aus diesem Grund besteht ein großer Bedarf an neuen Modellsystemen im Bereich der biomedizinischen Grundlagenforschung, um die Entstehung und die Progression von soliden Tumoren besser zu verstehen.

Eine erfolgreiche Methode, um die Grundlagenforschung der Tumorbologie voranzutreiben, ist die Generierung von genetisch definierten Mausmodellen. Dabei werden bestimmte Gene in der Maus so verändert, dass das menschliche Krankheitsbild nachgeahmt wird. Im Mausmodell ist es dann einfacher möglich, die molekularen Ursachen für die Tumorentstehung herauszuarbeiten.

### 1.3.3 Mausmodelle für Kolorektalkarzinome

Die Labormaus (*Mus musculus*) ist zu einem vielseitig verwendeten experimentellen System in der biomedizinischen Forschung geworden, das viel zur Aufklärung der Entstehung von Tumoren beigetragen hat. Es ist eines der am häufigsten eingesetzten Tiermodelle, da die Maus ähnliche Gewebe- und Organsysteme wie der Mensch hat, zahlreiche genetische und genomische Informationen vorliegen und es relativ einfach ist, die Mutagenese durch homologe Rekombination und transgene Technologien herbeizuführen. Das Mausgenom ist seit 2002 vollständig entschlüsselt (Nature 2002; 420:6915).

Transgene Mäuse bieten eine exzellente Möglichkeit, den Einfluss von Genen, die bei der intestinalen Karzinogenese beteiligt sind, zu untersuchen. Zusätzlich kann auch der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung von Krebs in mutierten Mäusen studiert werden. Weiterhin können erfolgreiche Mausmodelle als wichtiges Werkzeug für die Entwicklung von neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen dienen. Verschiedene Strategien wurden gewählt, um murine Modellsysteme für die Entstehung von Darmkrebs zu generieren:

Das erste beschriebene Mausmodell für eine Mutation im Apc Gen, die so genannte Apc<sup>Min</sup>-Maus (MIN: Multiple Intestinal Neoplasia), enthält eine „nonsense“ Mutation im Codon 850, die zufällig in einem Mutagenese-Screen generiert wurde. Wie der Name bereits andeutet, entwickeln heterozygote Tiere zahlreiche Adenome im Dünndarm (abhängig vom genetischen Hintergrund), die einen Verlust der Heterozygotie (LOH) im Apc Gen aufweisen (Su et al., 1992). Viele verschiedene Apc-Knock-in-Mäuse wurden durch die Einführung spezifischer Mutationen in das murine Apc Gen generiert, wie z.B. die Linien Apc<sup>580D</sup> (Shibata et al., 1997), Apc<sup>Δ716</sup> (Oshima et al., 1995), Apc<sup>1309</sup> (Quesada et al., 1998) und Apc<sup>1638T</sup> (Smits et al., 1999). Apc<sup>580D</sup>-, Apc<sup>Δ716</sup>-, Apc<sup>1309</sup>- und Apc<sup>Min</sup>-Mäuse kodieren für verkürzte Apc Proteine, denen nicht nur die karboxy-terminale Domäne, die an EB1 und Mikrotubuli bindet, fehlt, sondern auch die sieben 20-Aminosäure-Wiederholungen und alle SAMP-Motive, die für den Abbau von β-Catenin wichtig sind. Im Gegensatz zu diesen mutierten Apc Proteinen enthält die Apc<sup>1638T</sup>-Maus noch drei der sieben 20-Aminosäure-Wiederholungen und ein SAMP-Motiv. Dies führt zu bemerkenswerten Unterschieden in den Phänotypen der mutierten Apc-Mäuse. Die Homozygotie für vier der Apc Mutationen (Apc<sup>580D</sup>, Apc<sup>Δ716</sup>, Apc<sup>1309</sup> und Apc<sup>Min</sup>) resultiert im Sterben der Tiere während der Embryonalentwicklung. Homozygote Apc<sup>1638T</sup>-Tiere zeigen dagegen eine normale embryonale Entwicklung, die Nachkommen entstehen in der normalen Mendelschen Frequenz. Interessanterweise entwickeln die Apc<sup>1638T</sup>-Mäuse im Gegensatz zu den anderen Apc Mutanten keine Tumore, woraus man schließen kann, dass die karboxy-terminale Domäne keinen kritischen Einfluss auf die normale embryonale Entwicklung und die Tumorsuppression hat. In den erwähnten heterozygoten Mäusen (außer Apc<sup>1638T</sup>) entwickeln sich die meisten Tumore im Dünndarm und nicht wie beim Menschen im Kolon bzw. Rektum (Senda et al., 2007). Viele der Mutationen im menschlichen APC Gen treten im letzten und größten Exon auf. Dieser Typ der Mutation wird besser von der transgenen Apc<sup>1638N</sup>-Maus rekapituliert, bei der eine Neomycin-Kassette in entgegengesetzter Orientierung im Codon 1638 des murinen Apc Gens eingeführt wurde (Fodde et al., 1994) (Abb.1.7). Heterozygote Apc<sup>1638N</sup>-Mäuse entwickeln ACF im Kolon und ca. 5-6 Adenome im Dünndarm in den ersten sechs Lebensmonaten (Pretlwo et al., 2003). Außer diesem intestinalen Tumor-Phänotyp ist das Apc<sup>1638N</sup>-

Mausmodell durch ein weites Spektrum an extra-intestinalen, teilweise aber seltenen Manifestationen charakterisiert, wie etwa Desmoide, epidermale Zysten, Brusttumore und Magentumore (Fodde et al., 1994; van der Houven van Oordt et al., 1997; Smits et al., 1998). Die  $Apc^{1638N}$ - und die  $Apc^{1638T}$ -Maus sind identisch, was die Position des verkürzten Codons betrifft. Allerdings ist das  $Apc^{1638T}$ -Protein in einem Verhältnis von 1:1 zum Wildtyp-Apc vorhanden, während in der  $Apc^{1638N}$ -Maus nur geringe Mengen (1-2%) des mutierten Proteins gebildet werden. Ursache ist die Orientierung der Neomycin-Kassette, die jeweils am Kodon 1638 im Apc Genlokus integriert wurde. Ein weiteres FAP-Mausmodell ist die  $Apc^{1572T}$ -Maus, die durch Einführen eines „nonsense“ Codons an der Position 1572 generiert wurde (Smits et al., 1999). Diese Apc Mutation resultiert in der stabilen Expression eines verkürzten Proteins, das alle  $\beta$ -Catenin-Bindedomänen und drei von sieben 20-Aminosäure-Wiederholungen enthält, aber keines der SAMP-Motive, wie in der  $Apc^{1638T}$ -Mutante. Überraschenderweise entwickeln heterozygote  $Apc^{1572T}$ -Tiere invasive und metastasierende Brusttumore, Desmoide, epidermale Zysten und Lebertumore, aber keine Darmtumore. Die unterschiedlichen Phänotypen aller Apc Mausmodelle korrelieren stark mit der spezifischen „Dosis“ an transkriptionell aktivem  $\beta$ -Catenin (Gaspar und Fodde, 2004). Die Bildung von Adenomen im Kolon konnte durch die Erzeugung von Apc Keimbahn-Mutationen erreicht werden, die mit Hilfe einer konditionalen „Targeting-Strategie“ und der Expression der Cre-Rekombinase eingeführt wurden (Shibata et al., 1997).

Mehrere transgene und Knockout-Mäuse wurden hergestellt, um die Rolle der „Mismatch“-Reparaturmaschinerie bei der Karzinogenese zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Dysfunktion in diesen Proteinen zur Entstehung von Tumoren beiträgt (Edelmann et al., 1996; Reitmair et al., 1996a). Die Inaktivierung des murinen *SMAD3* Gens, einem Faktor des TGF $\beta$ -Signalweges, sowie die Deletion der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase führen zu Darmkrebs (Zhu et al., 1998; Sasaki et al., 2000). Dies wird allerdings noch kontrovers diskutiert (Barbier et al., 2001). Eine Kombination von Mutationen der „Mismatch“-Reparaturgene mit mutierten Allelen von *APC* führt zu einer erhöhten Sterblichkeit und beschleunigt die Tumorgenese (Reitmair et al., 1996b; Edelmann et al., 1999).

Um die Rolle von onkogenem *KRAS* bei der kolorektalen Karzinogenese zu verstehen, wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt. Die transgene Expression von  $Kras^{V12G}$  in den Enterozyten der Villi unter der Kontrolle des FABP-Promotors (FABP: Fatty Acid Binding Protein) verursacht intestinale Dysplasien, aber es wurden keine Neoplasien entdeckt (Kim et al., 1993; Coopersmith et al., 1997). Johnson und Mitarbeiter demonstrieren ein elegantes Mausmodell für die Ras-abhängige Karzinogenese, das auf spontanen Rekombinations-Ereignissen im gesamten Tier beruht. Diese Mäuse entwickeln keine Darmtumore, zeigen aber eine hohe Prädisposition für Lungenkrebs und andere Tumorarten (Johnson et al., 2001). In der Gruppe von Robine wurde eine 9kb große regulatorische Region des murinen *Villin* Gens für die selektive Expression des onkogenen  $Kras^{V12G}$  in Darmepithelzellen verwendet (Janssen et al., 2002) (Abb.1.7). In diesen Mäusen wird das transgene  $Kras^{V12G}$  in niedrigen Mengen (12% des endogenen Ras) exprimiert. Diese Tiere entwickeln 2-3 Tumore pro Maus zu einem relativ späten Zeitpunkt (12 Monate). Adenome und invasive Karzinome wurden hauptsächlich im Dünndarm gefunden, während sich im Kolon vorrangig ACF entwickelten. Während in diesem Modell die Inaktivierung von Apc für die

Tumorgenese nicht erforderlich zu sein scheint, weisen 40% der Läsionen einen spontan veränderten *p53* Locus auf (Janssen et al., 2002).

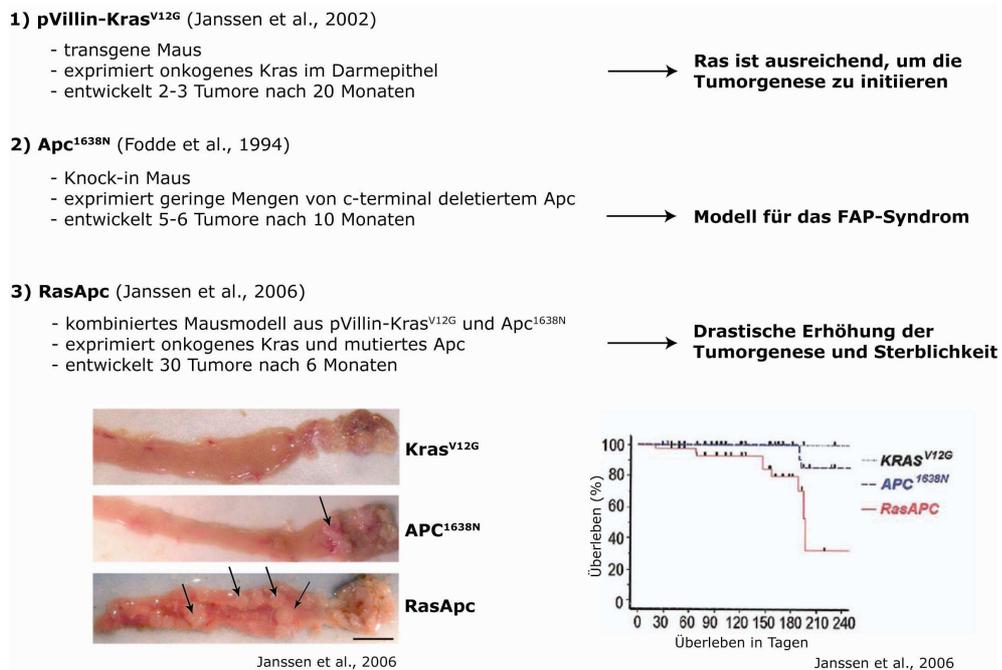
Gegensätzliche Ergebnisse wurden von einem endogen veränderten *Kras*<sup>V12G</sup>-Allel (Expression von *Kras*<sup>V12G</sup>-Onkoprotein mit einem Markerprotein ( $\beta$ -geo)) berichtet, dessen Expression nicht die normale Krypt-Villus-Architektur stört und nur zu malignen Transformationen in einem Teil der Lungenzellen führt (Guerra et al., 2003). Es wird angenommen, dass diese Unterschiede durch die unterschiedlichen Ursprünge der Mutationen, vor allem die unterschiedlichen Expressionsniveaus der mutierten *Kras*-Allele zurückzuführen ist.

Interessanterweise kommt es bei der Kombination aus den beiden Mausmodellen *Apc*<sup>1638N</sup> und *Kras*<sup>V12G</sup> zu einem drastischen, zehnfachen Anstieg der Tumorzahl und zu einer beschleunigten Progression im Vergleich zu den einzel-transgenen Tieren, was zu einer starken Erhöhung der Morbidität und Mortalität führt. Verschiedene Befunde zeigen, dass diese Effekte durch eine synergistische Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in Zellen mit onkogenem *KRAS* und *APC* Mutationen hervorgerufen werden (Janssen et al., 2006) (Abb.1.7).

Auch die Rolle von  $\beta$ -Catenin bei der Tumorentstehung wurde mittels verschiedener Mausmodelle untersucht. So entstehen Tumore durch die transgene Expression von  $\beta$ -Catenin in unterschiedlichen Geweben wie der Brustdrüse und der Haut (Gat et al., 1998; Chan et al., 1999; Imbert et al., 2001; Cheon et al., 2002). Beim Mausmodell von Harada und Mitarbeitern wurde das Exon3 des murinen  $\beta$ -Catenin Gens mit LoxP-Sequenzen flankiert, was durch zusätzliche Expression der Cre-Rekombinase zu einem mutierten  $\beta$ -Catenin Protein führt, dem amino-terminal 76 Aminosäurereste fehlen. Exon3 kodiert die Serin- und Threonin-Aminosäurereste, die durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden. Die Darm spezifische Expression des mutierten  $\beta$ -Catenins wird durch die Kreuzung mit der *Krt1-19Cre*-Maus (Zytokeratin 19, *Ck19* Gen) bzw. mit *FabplCre*-Maus (rat liver fatty acid binding protein gene) gewährleistet. Diese Mäuse entwickeln im jungen Alter zahlreiche Polypen im Dünndarm (geschätzte 3000 Tumore in den *Krt1-19Cre*-Mäusen, und 200-700 Tumore in den *FabplCre*-Mäusen) und wenige Mikroadenome im Kolon (Harada et al., 1999). Ein weiteres Mausmodell, basierend auf der transgenen Expression von  $\Delta$ N131 $\beta$ -Catenin unter der Kontrolle des Calbindin-D9K-Promotors, entwickelt schon im Alter von 3-4 Wochen multifokale dysplastische Läsionen im Dünndarm (Ramagnolo et al., 1999), allerdings keine Tumore im Kolon. Zusätzlich ist in diesen Tieren die Zahl der apoptotischen Zellen in den Villi 3-4 fach höher als in nicht-transgenen Mäusen. Da allerdings der Calbindin Promotor nicht nur in differenzierten Epithelzellen der Villi, sondern auch in der Niere aktiv ist, führt die Expression von  $\Delta$ N131- $\beta$ -Catenin zu einer starken Zystenbildung und veränderten Nierenstruktur, was zum frühen Sterben der transgenen Tiere führt. Daher ist dieses Modell ungünstig, um einen langfristigen Einfluss von  $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung zu untersuchen.

All diese Mausmodelle liefern zahlreiche Hinweise auf die Dosis-Abhängigkeit der Wnt-Aktivierung. Auch die Arbeitsgruppe von Taketo zeigte mit Hilfe von mutierten Mäusen mit hypomorphen *Apc*-Allelen, dass die Menge der intestinalen Polypen umgekehrt proportional ist zur Menge an *Apc*-Protein, das heißt, zur relativen Stärke des Wnt-Signalweges. Ein Polyp wird pro Maus gebildet, wenn sich das *Apc*-Proteinlevel auf 15% der Wildtyp-Menge verringert (Li, Q. et al., 2005). Allerdings gibt es bislang keine Befunde über die molekularen Unterschiede zwischen diesen unterschiedlichen Modellen, und es bleibt zu untersuchen, welche Genprodukte für die Unterschiede

in der Anzahl der entstehenden Polypen verantwortlich sind. Um diese transkriptionellen Unterschiede herauszuarbeiten, sollte in dieser Arbeit ein Mausmodell generiert und analysiert werden, das onkogenes  $\beta$ -Catenin in relativ physiologischen Mengen und ausschließlich im Darmepithel exprimiert.



**Abb.1.7: Mausmodelle für die kolorektale Tumorgenese**

Überblick über die in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Mausmodelle für die Entstehung von Darmkrebs.

## 1.4 Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg wird durch viele verschiedene extrazelluläre Stimuli, wie Wachstumsfaktoren und Insulin, sowie durch den Ras-Signalweg aktiviert, und reguliert wichtige zelluläre Prozesse, wie Transkription, Translation, Zellproliferation, Zellwachstum und Zellüberleben (Datta et al., 1999; Vivanco und Sawyers, 2002). Die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB (Proteinkinase B) ist die wichtigste Kinase in diesem Signalweg. Eine Störung der Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade ist mit der Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus und Autoimmunität verbunden (Di Cristofano et al., 1999; Testa und Bellacosa, 2001; Hill et al., 2002; Nicholson und Anderson, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002). Die Entstehung und Progression von Tumoren resultiert häufig aus dem gestörten Verhältnis zwischen Zellproliferation und Apoptose. Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert beide Prozesse und spielt nicht nur eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum, sondern ist auch ein potentielles Ziel für therapeutische Behandlungen. Fast 40% aller kolorektalen Tumore weisen Veränderungen in einem der PI3K-Signalweg-Gene auf (Parsons et al., 2005). Dagegen konnte in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe keine Aktivierung des PI3/Akt-Signalweges in Mausmodellen für Kolorektalkarzinome nachgewiesen werden (Janssen et al., 2002 und 2006).

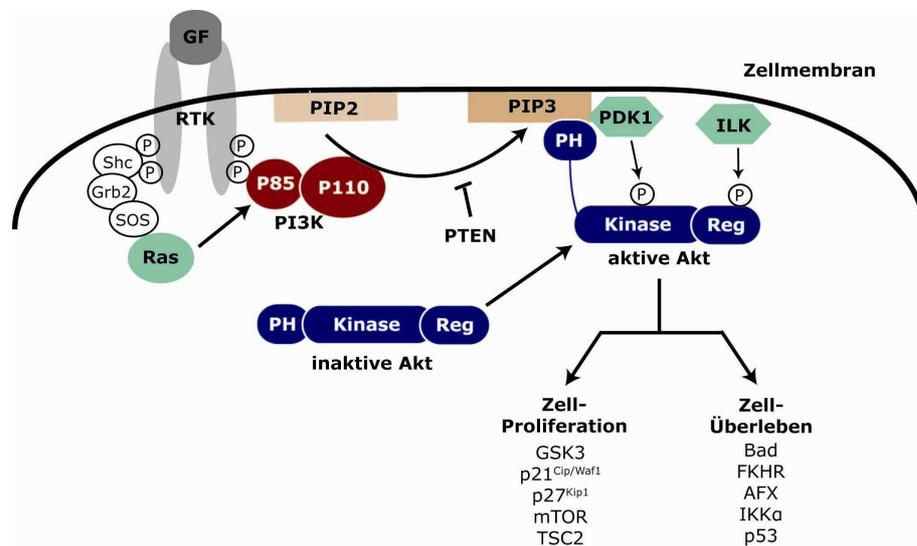
### 1.4.1 Mechanismus der PI3-Kinase/Akt-Aktivierung

Die PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase) ist für die Phosphorylierung von 3 Positionen im Inositolring des Plasmamembran-Lipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ) verantwortlich, was zur Bildung von Phosphoinositol-3-Phosphat ( $PIP_3$ ) führt, einem wichtigen „Second-Messenger“ für Überlebenssignale und Insulin in der Zelle (Fruman et al., 1998) (Abb.1.8). Die PI3-Kinasen sind Heterodimere, die aus einer katalytischen Untereinheit (P110) und einer regulatorischen Untereinheit (P85) bestehen und durch Rezeptoren mit Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität (RTK: Receptor Tyrosine Kinase) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR: G-Protein Coupled Receptors) aktiviert werden (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999; Katso et al., 2001). Aktiviertes Ras kann mit der katalytischen Untereinheit der RTKs über den Shc-Grb2-SOS Adaptor-Protein-Komplex interagieren und so die PI3-Kinase aktivieren. Die Effekte der gebildeten Phosphoinositol-3-Phosphate ( $PIP_3$ ) in der Zelle werden durch die spezifische Bindung von zwei Protein-Lipid-Bindedomänen (FYVE- und PH-Domäne) vermittelt (Pawson und Nash, 2000). Proteine, welche die PH-Domäne (PH: Pleckstrin Homolog) enthalten, sind wichtige Mediatoren für die PI3K-Signalkaskade. Die PH-Domänen sind globuläre Protein-Domänen, die aus ca. 100 Aminosäureresten bestehen und in vielen Proteinen wie etwa der PDK1 (Serine/Threonine Kinase 3'-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) und Akt vorkommen.

Die Akt/PKB-Kinase ist eine Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 57 kDa, die als wichtiger Regulator für das Zellüberleben und die Zellproliferation fungiert. Das Genom der Säugetiere enthält drei *AKT* Gene, welche die Isoformen PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 und PKB $\gamma$ /Akt3 kodieren (Datta et al., 1999). Die Isoformen weisen eine starke Homologie in der Aminosäure-Sequenz auf (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000) und bestehen alle drei aus einer konservierten

Domänenstruktur: eine amino-terminale PH-Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne und eine karboxy-terminale regulatorische Domäne. Alle drei *AKT* Gene werden ubiquitär exprimiert, wobei Akt1 vorrangig im Gehirn, im Herz und in der Lunge vorhanden ist, während Akt2 hauptsächlich im Skelettmuskel und im braunen Fettgewebe des Embryos gebildet wird. Eine Akt3 Expression findet man vor allem im Gehirn, in der Niere und im embryonalen Herzen (Coffer und Woodgett, 1991; Altomare et al., 1995; Altomare et al., 1998; Brodbeck und Hemmings, 1999).

Nach der Produktion von PIP<sub>3</sub> durch PI3K an der inneren Seite der Plasmamembran transloziert Akt vom Zytoplasma zur Membran und bindet dort an die Phospholipide. Die Interaktion der PH-Domäne von Akt mit PIP<sub>3</sub> führt zu einer Änderung der Akt Konformation, wodurch die zwei Haupt-Phosphorylierungsstellen (Thr308 in der Kinase-Domäne, sowie Ser473 in der karboxy-terminalen regulatorischen Domäne) zugänglich werden (Alessi et al., 1996). Weiterhin vermittelt die PH-Domäne die Anlagerung von Akt und PDK1 durch Heterodimerisierung. PDK1, das konstitutiv aktiviert ist, phosphoryliert Akt am Thr308, was zur Stabilisierung der aktiven Konformation führt. Die Phosphorylierung von Thr308 ist für die Aktivierung von Akt erforderlich, und die Phosphorylierung des Ser473-Restes ist für die vollständige Aktivierung der Kinase notwendig. Wie Ser473 phosphoryliert wird, ist noch nicht vollständig verstanden, aber es gibt Hinweise, dass diese Stelle autophosphoryliert (Toker und Newton, 2000) oder durch andere Serin-Kinasen wie der ILK (Integrin Linked Kinase) phosphoryliert wird (Persad et al., 2001). In einem letzten Schritt gelangt die aktive Akt-Kinase durch einen noch nicht bekannten Mechanismus ins Zytoplasma und in den Kern, wo viele ihrer Substrate lokalisiert sind (Delcomenne et al., 1998) (Abb.1.8).



**Abb.1.8: Mechanismus der Akt-Aktivierung**

Die Aktivierung der Akt-Kinase erfolgt durch die PI3-Kinase und führt zur Kontrolle wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Zellproliferation und dem Zellüberleben. Details siehe Text. GF: Growth Factor, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, P: Phosphorylierung, Reg: Regulatorische Domäne, RTK: Receptor Tyrosine Kinase, Shc: SH2 domain containing transforming protein, SOS: son of sevenless.

### 1.4.2 Die Rolle von aktivierter Akt

Das aktivierte Akt Protein moduliert die Funktion vieler Substrate, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind, wie GSK3 $\beta$ , Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Inhibitoren (p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>), mTOR (mammalian Target of Rapamycin) und TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2). Cross und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Akt die Kinase GSK3 $\beta$  durch eine direkte Phosphorylierung an einem amino-terminal gelegenen regulatorischen Serinrest inhibiert. Die Inhibition der GSK3 $\beta$  durch Akt verhindert die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, was zur Aktivierung der Transkription verschiedener Wnt-Zielgene führt, wie etwa CyclinD1, das die Zellzyklusprogression induziert (Cross et al., 1995). Akt phosphoryliert auch p21<sup>Waf1/Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, und inhibiert so deren anti-proliferativen Effekt durch das Zurückhalten dieser Inhibitoren im Zytoplasma (Liang et al., 2002; Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002; Zhou et al., 2001a). Dadurch verhindert Akt die Inhibition der Aktivierung der Cyclin/CDK Komplexe, insbesondere von CyclinD1/CDK4 (Gao et al., 2004). Akt erhöht die Proteinsynthese, etwa durch die erhöhte Phosphorylierung von mTOR. Aktiviertes mTOR fördert die Translation von CyclinD1 mRNA (Muisse-Helmericks et al., 1998). Die P70 ribosomale Protein S6 Kinase (P70S6K1) wird durch mTOR aktiviert, während mTOR das eukaryotische Initiationsfaktor 4E Bindeprotein (4EBP1) inhibiert (Inoki et al., 2002; Tee et al., 2002). Beide Proteine agieren als Regulatoren der Translation (Inoki et al., 2002; Potter et al., 2002). Zusätzlich inhibiert aktivierte P70S6K1 die G1-Zellzyklusprogression (Gao et al., 2004). TSC2 wird ebenso durch Akt phosphoryliert und fördert so das Wachstum. Phosphoryliertes TSC2 kann keinen Komplex mehr mit TSC1 bilden, der P70S6K1 (Aktivator der Translation) inhibiert und 4E-BP (Inhibitor der Translation) aktiviert (Inoki et al., 2002; Potter et al., 2002).

Eine wichtige Funktion von aktivierter PI3K in der Zelle ist die Inhibition der Apoptose (Yao und Cooper, 1995), und Akt ist ein zentraler Faktor, der das PI3K-abhängige Zellüberleben vermittelt. Akt wird als anti-apoptotischer Faktor in vielen verschiedenen Zelltod-Ereignissen gesehen, wie oxidativem und osmotischen Stress und ischämischem Schock (Franke et al., 1997; Downward, 1998). Die Überexpression von Akt zeigt einen anti-apoptotischen Effekt in vielen Zelltypen, was in der Resistenz bzw. der Verzögerung des Zelltodes resultiert (Fresno et al., 2004). Akt reguliert das zelluläre Überleben durch die Phosphorylierung von Substraten, die direkt oder indirekt die Apoptose beeinflussen. So phosphoryliert und inaktiviert Akt das pro-apoptotische Protein Bad, das die Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien kontrolliert (Datta et al., 1997; Del Peso et al., 1997). Akt übt auch eine indirekte Kontrolle der Apoptose aus, indem es die Regulation der Transkription beeinflusst. Die Phosphorylierung der „Forkhead“ Familie von Transkriptionsfaktoren (AFX, FKHR und FKHL1) durch Akt inhibiert die Transkription von pro-apoptotischen Genen wie *FasL*, *IGFBP* und *Bim* (Datta et al., 1999; Nicholson und Anderson, 2002). Akt kann auch die IkappaB Kinase alpha (IKK $\alpha$ ) phosphorylieren und aktivieren, was wiederum zur Phosphorylierung von IkappaB (I $\kappa$ B) führt, ein Signal für den Abbau von I $\kappa$ B (Ozes et al., 1999; Kane et al., 1999). Das führt dazu, dass NF $\kappa$ B (nuclear Factor kappaB) aktiviert wird, in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von NF $\kappa$ B-abhängigen Überlebensgenen (z.B. Bcl-XL, Caspase Inhibitoren und c-Myb) anschaltet (Barkett und Gilmore, 1999; Lauder et al., 2001). Interessanterweise reguliert Akt indirekt das Tumorsuppressorprotein p53, das als Sensor für zellulären Stress agiert

und Stresssignale in apoptotische Signale umwandelt (Evan und Vousden, 2001). Akt phosphoryliert das Mdm2 Protein (murine double minute-2) und bewirkt so dessen Verlagerung in den Zellkern, wo es p53 destabilisiert (Mayo und Donner, 2001; Zhou et al., 2001b). Durch die Förderung des Abbaus von p53 stört Akt die zelluläre Stressantwort und erhöht so die Überlebens-Aktivität der Zellen.

### 1.4.3 Negative Regulatoren des PI3K/Akt-Signalweges

Die negative Regulation des PI3K/Akt-Signalweges erfolgt hauptsächlich durch die Lipid- und Protein-Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10), die ursprünglich als ein Tumorsuppressor identifiziert wurde und häufig durch genetische und somatische Mutationen in menschlichen Krebsarten verändert ist (Myers und Tonks, 1997; Cantley und Neel, 1999). Das Haupt-Lipid-Substrat von PTEN ist PIP<sub>3</sub>, das ein Produkt der PI3K ist. PTEN reduziert die Menge an PIP<sub>3</sub>, indem es dieses durch Dephosphorylierung am Inositol wieder in PIP<sub>2</sub> überführt (Maehama und Dixon, 1998) (Abb.1.8). Da PTEN so der Aktivierung von Akt entgegenwirkt, führt eine inaktivierende Mutation oder der Verlust von PTEN zu erhöhten PIP<sub>3</sub> Konzentrationen in der Zelle, was eine erhöhte Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose zur Folge hat. Die Abwesenheit von PTEN korreliert stark mit der Aktivierung von Akt in Krebszellen. Tatsächlich zeigen viele Arbeiten, dass eine gestörte Expression und Funktion von PTEN in humanen Krebszelllinien und Primärtumoren vorliegt (Myers und Tonks, 1997; Cantley und Neel, 1999; Eng, 2003; Wu et al., 2003; Munoz et al., 2004; Karoui et al., 2004; Nassif et al., 2004). Der Verlust der PTEN Aktivität führt zu einer permanenten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges. Akt wird auch durch SHIP (SH2-containing Inositol Phosphatase) und CTMP (Carboxy Terminal Modulation Protein) negativ reguliert. SHIP ist eine Phosphatase, die PIP<sub>3</sub> an einer anderen Stelle dephosphoryliert als PTEN, und so auch die intrazellulären Konzentrationen von Akt-aktivierenden Phosphoinositiden reguliert (Taylor et al., 2000; Leslie et al., 2001). Es gibt allerdings keine Hinweise, dass der Verlust von SHIP in humanen Tumoren auftritt, und die Wichtigkeit der PI3K/Akt Regulierung durch SHIP *in vivo* ist noch unklar. CTMP ist ein unlängst entdecktes Protein, das an Akt binden kann. Maira und Mitarbeiter zeigten, dass CTMP spezifisch an die karboxy-terminale regulatorische Domäne von Akt an der Plasmamembran bindet und die Aktivität von Akt durch die Inhibition der Phosphorylierung am Ser473 und Thr308 *in vitro* bewirkt (Maira et al., 2001). Bis jetzt gibt es noch keine Befunde darüber, ob Veränderungen von CTMP in humanen Tumoren vorhanden sind.

### 1.4.4 PI3K/Akt-Kaskade und die Entstehung von Krebs

Wie bereits beschrieben, wird die PI3K/Akt-Kaskade durch die Liganden-abhängige Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Diese Zelloberflächenrezeptoren sind in einer großen Zahl von humanen Tumoren überexprimiert oder konstitutiv aktiv, was dazu führt, dass die Signalwege, die über diese Rezeptoren gesteuert werden, aktiviert werden. Das am besten untersuchte Beispiel hierfür ist der Tyrosinkinase

Rezeptor ErbB2, der durch Genamplifikation in Brustkrebs und anderen Krebsarten überexprimiert wird (Blume-Jensen und Hunter, 2001). ErbB2 dimerisiert mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie. Heterodimere, die ErbB2 enthalten, sind potentielle Aktivatoren für viele Signalwege, die an Zellwachstum, Apoptose-Hemmung und Invasion beteiligt sind (Olayioye et al., 2000). Zhou und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ErbB2-ErbB3 Dimere den PI3K/Akt-Signalweg in Tumorzellen stark aktivieren (Zhou et al., 2000). Eine Aktivierung von Akt kann auch durch onkogenes Ras erfolgen.

Bis jetzt wurden keine Mutationen von *Akt* in humanen Tumoren identifiziert. Aber es wurden Genmutationen von *PIK3CA*, das die katalytische Untereinheit P110 von PI3K kodiert, in Kolon-, Magen-, Brust- und Lungenkrebs beschrieben (Samuels et al., 2004). Zusätzlich zeigten mehrere Studien eine Genamplifikation von *PIK3C* in Eierstockkrebs (Shayasteh et al., 1999), Gebärmutterhalskrebs (Ma et al., 2000) und Magenkrebs (Byun et al., 2003).

Es gibt dagegen Hinweise für eine Genamplifikation von *Akt*. Als erstes identifizierte Staal die Amplifikation des *Akt1* Gens in einzelnen Magenkarzinomen (Staal, 1987). Eine *Akt2* Genamplifikation wurde in Eierstock-, Pankreas-, Magen- und Brusttumoren gefunden (Bellacosa et al., 1995; Cheng et al., 1996). Die Überexpression von Akt3 mRNA konnte in Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen werden (Nakatani et al., 1999). Des Weiteren findet man Mutationen von PTEN in primären Tumoren der Schilddrüse, der Brust, des Kolons, der Prostata, des Uterus und des zentralen Nervensystems (Ittmann, 1998; Garcia et al., 1999; Wang et al., 2000; Frisk et al., 2002; An et al., 2004; Nassif et al., 2004; Saito et al., 2004). Außerdem zeigten Goel und Mitarbeiter eine häufige Inaktivierung von PTEN durch die Hypermethylierung des Promotors in kolorektalen Tumoren (Goel et al., 2004). Alle diese Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Akt durch PI3K mit der Entstehung von Krebs assoziiert ist.

Aktivierte Akt wurde in humanen Tumoren *in vivo* detektiert. Es wurde auch von einer Überexpression von Akt-Isoformen in Brust-, Kolon-, Eierstock-, Pankreas und Prostatakrebs berichtet (Kandel und Hay, 1999; Roy et al., 2002; Vivanco und Sawyers, 2002; Altomare et al., 2003). Interessanterweise korreliert aktive Akt mit einer schlechten Prognose in vielen Krebsarten (Lee et al., 2001; Ermoian et al., 2002; Perez-Tenorio und Staal, 2002; Nam et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). Des Weiteren fördert die Aktivierung von Akt die Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (Brognard et al., 2001; Clark et al., 2002; Tanno et al., 2004). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges einen möglichen therapeutischen Wert hat. Die zwei Substanzen Wortmannin und LY294002 wurden bereits als Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges in klinischen Studien untersucht.

#### **1.4.5 Mausmodelle für den PI3K/Akt-Signalweg**

Die gezielte Deletion von PTEN in Mäusen rekapituliert viele der Folgen eines Verlustes von PTEN in menschlichen Tumoren. Mäuse, die heterozygot für das PTEN Knockout-Allel sind, entwickeln Tumore im Lymph-, Schilddrüsen-, Brust- und Prostatagewebe (Di Cristofano et al., 1998). Eine gewebespezifische Deletion von PTEN in T-Zellen verursacht aggressive Lymphome, und im Brustdrüsengewebe führt die Deletion von PTEN zu Brustkrebs (Kishimoto et al., 2003). Die Folgen

von Veränderungen in anderen Komponenten dieses Signalweges wurden ebenfalls in Mäusen untersucht. So entwickeln Mäuse mit einer heterozygoten Gen-Deletion für TSC2 Adenome in der Niere und in der Lunge, analog zu den Beobachtungen bei menschlichen TSC2-Erkrankungen (Onda et al., 1999). Weiterhin führt die transgene Expression von aktivierter Akt in der murinen Prostata zu intraepithelialen Neoplasien (Majumder et al., 2003). Mausmodelle können auch dazu verwendet werden, um die Kooperation von verschiedenen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von aktiviertem Ras und Akt in aggressiven Glioblastomen resultiert, während die Aktivierung von Akt oder Ras allein nicht für die Initiation von Tumoren ausreicht (Holland et al., 2000). Mäuse, die heterozygote Gen-Deletionen für PTEN und gleichzeitig für den P27<sup>Kip1</sup>-Lokus tragen, entwickeln Prostatakrebs mit 100% Inzidenz. Diese Mausmodelle wurden erfolgreich eingesetzt, um zu zeigen, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 und der mTOR-Inhibitor CCI-779 *in vivo* effektiv das Tumorstadium reduzieren (Di Cristofano et al., 2001). Weiterhin zeigten He und Mitarbeiter erst kürzlich, dass eine Deletion von PTEN zur Bildung von intestinalen Polypen führt. PTEN ist an der Regulation der Proliferationsrate und Zahl der intestinalen Stammzellen beteiligt; es kommt bei einem Verlust von PTEN zur Vermehrung dieser Zellen, was die Spaltung und Neubildung von Krypten zur Folge hat. Außerdem zeigt diese Arbeit, dass der PTEN/Akt-Signalweg die Aktivierung der Stammzellen durch die Kontrolle von nukleärem  $\beta$ -Catenin reguliert: Akt phosphoryliert  $\beta$ -Catenin am Serin522, was zu Aktivierung des Wnt-Signalweges führt (He et al., 2007).

Allerdings standen bislang keine darmepithel-spezifischen Mausmodelle für Akt zur Verfügung. Um die Rolle von aktivierter Akt bei der Tumorgenese im Darmtrakt zu untersuchen, sollte daher in dieser Arbeit ein gewebsspezifisches und induzierbares Mausmodell generiert und analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% N,N` Methylbisacrylamid)	Biorad, München
Agarose	Invitrogen, Leek, NL
Allprep Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Antibiotic/Antimycotic	Invitrogen, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase	Sigma-Aldrich, Stammheim
Diethylether	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Dispase	Roche, Mannheim
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Reagenz	Pierce, Bonn
EGF	Sigma-Aldrich, Stammheim
Envision+® System-HRP	Dako, Carpinteria, USA
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Stammheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
GeneRuler™ 100bp DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe

---

Glycerin Gelatine	Sigma-Aldrich, Stammheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Hepes	Biochrom, Berlin
Insulin	Novo Nordisk, Dänemark
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Maisöl	Sigma-Aldrich, Stammheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Stammheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Stammheim
NP-40 (Igepal)	MP Biomedicals, Eschwege
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, Stammheim
Oligo-dT Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
Pefablock	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Stammheim
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Stammheim
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Stammheim
Protease Inhibitor Cocktail Mini	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim
Random Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Sepharose (Protein A und G)	Sigma-Aldrich, Stammheim

Sybr Green PCR Master Mix	Eurogentec, Belgien
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Stammheim
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
TissueTek	Sakura, Zoeterwoude, NL
Trireagenz	Sigma-Aldrich, Stammheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
TEMED	Biorad, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot
Xylol	Hedinger, Stuttgart

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

3MM Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Cryomold	Miles, Elkhart, USA
Gel Purification Kit	Qiagen, Hilden
Hyperfilm (Röntgenfilme)	Amersham, Braunschweig
Kanülen	B. Braun, Melsungen
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plastikwaren	Falcon, Heidelberg
	Nunc, Naperville, USA
	Corning, New York, USA
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Sterilfilter	Satorius, Göttingen

### 2.1.3 Geräte

Cs <sup>137</sup> Bestrahlungsgerät	Buchler, Braunschweig
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Kryostat	Leica, Wetzlar
Dounce Homogenisator	Wheaton, Mellville, USA
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fischer Scientific, Ulm
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
GeneAmp PCR-System 7900	Applied Biosystems, Foster City, USA
Gel Doc XR System	Bio Rad, München
Heizblock	Kleinfeld, Gehrden
Mikroskope (Stemi 2000-C, Axiovert 200M, AxioLab)	Zeiss, Jena

NanoDrop	Nanodrop Techn., Montchanin, USA
pH-Meter	Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim
Proteintransfer Transblot SD	Biorad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad Mixing Rotor	Renner, Darmstadt
Rührer Monotherm	Vaiomag, Oberschleißheim
Schüttler	Memmert, Schwabach
Sterilbank	Kendro Laboratory Products, München
Stromquellen Power Pack P25	Biometra, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

#### 2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

##### **AFA-Fixierungspuffer**

- 75% Ethanol
- 20% Formaldehyd
- 5% Essigsäure

##### **10% Ammoniumperoxidsulfat (APS)**

- 1 g Ammoniumperoxidsulfat
- 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

##### **CLB-Puffer**

- 10 mM Hepes
- 10 mM NaCl
- 5 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5 mM EDTA
- Protease Inhibitor Cocktail
- Pefablock

##### **DEPC H<sub>2</sub>O**

- 0,1% DEPC in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- 12-24 h rühren
- autoklavieren

### **Digestion-Medium**

- 25 ml DMEM
- 125 µl FKS
- 250 µl Penicillin/Streptomycin
- 250 µl Glutamin
- 250 µl Gentamycin
- 250 µl Antibiotic/Antimycotic
- 62,5 µl Insulin
- 5 µl EGF (50 µg/ml)
- 1 mg Dispase
- 2 mg Collagenase

### **DNA-Auftragspuffer (6x)**

- 1 ml 10x TAE
- 1 ml Orange G (10 mg/ml)
- 5 ml Glycerin
- 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### **Main-Culture-Medium**

- 40 ml DMEM
- 10 ml FKS
- 500 µl Penicillin/Streptomycin
- 500 µl Glutamin
- 500 µl Gentamycin
- 500 µl Antibiotic/Antimycotic
- 125 µl Insulin
- 10 µl EGF (50 µg/ml)

### **Methylenblau-Färbelösung**

- 0,2% Methylenblau
- mit PBS ansetzen

### **Mouse-Tail-Lysis Puffer**

- 0,1 M NaCl
- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 0,5% SDS
- 5 mM EDTA
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen

### **200 mM Natriumorthovanadat**

- 370 mg Natriumorthovanadat
- 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

- pH 10 einstellen
- um das Natriumorthovanadat zu hydratisieren, die Lösung kochen bis die Farbe von gelb nach farblos umschlägt
- auf RT abkühlen lassen, pH 10 nachjustieren
- wiederholen, bis die Lösung farblos und der pH 10 stabil bleibt

#### **Ponceau-Färbelösung**

- 0,2% Ponceau S
- 5% Essigsäure
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen

#### **RIPA-Puffer**

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1% NP-40
- 0,25% Natriumdeoxycholat
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen
- pH auf 7,4 einstellen
- vor jeder Anwendung frisch dazu gegeben:
  - 20x Protease Inhibitor Cocktail
  - 100 mM Pefablock (AEBSF)
  - 20% SDS
  - 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
  - 100 mM NaF
  - 100 mM β-Glycerolphosphat
  - 100 mM PMSF
  - 100 mM Benzamidin
  - 100 mM Pepstatin

#### **3x SDS-Probenpuffer**

- 2,4 ml 1M Tris/HCl, pH 6,8
- 3,0 ml 20% SDS
- 3,0 ml Glycerin
- 1,6 ml β-Mercaptoethanol
- 6 mg Bromphenolblau

#### **5x SDS-Laufpuffer**

- 248 mM Tris
- 2 M Glycin
- 17 mM SDS
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen

### **50x TAE**

- 2 M Tris, pH 8
- 0,5 M Eisessig
- 50 mM EDTA

### **Tamoxifen (1mg/100 µl)**

- 50 mg in 500 µl Ethanol lösen
- mit Maisöl auf 4 ml auffüllen
- gut mischen

### **1x TBST**

- 20 mM Tris/HCl, pH 7,6
- 140 mM NaCl
- 0,1% Tween 20

### **Tissue-Collection-Medium**

- 50 ml DMEM
- 1,25 ml FKS
- 500 µl Penicillin/Streptomycin
- 500 µl Glutamin
- 500 µl Gentamycin
- 500 µl Antibiotic/Antimycotic

### **Transfer-Puffer (Transblot)**

- 48 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 39 mM Glycin
- 20% Methanol
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen

### **TSE-Puffer**

- 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 0,3 M Saccharose
- 1 mM EDTA
- 0,1% NP-40
- mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ansetzen
- Protease Inhibitor Cocktail
- Pefablock

### **Waschmedium**

- 50 ml DMEM
- 2,5 ml FKS
- 500 µl Glutamin

**X-Gal Fixierungspuffer**

- 1% PFA
- 0,2% Glutaraldehyd
- 0,02% NP-40
- mit PBS ansetzen

**X-Gal Färbepuffer**

- 10 mM  $K_3Fe(CN)_6$
- 10 mM  $K_4Fe(CN)_6$
- 0,1% Triton X-100
- 2 mM  $MgCl_2$
- 1,5 mg X-Gal
- mit PBS ansetzen

**2.1.5 Versuchstiere**

Alle Mäuse wurden im optimierten Hygienebereich (OHB) des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten. Alle Mausstämme haben einen C57BL/6 Hintergrund.

Mausstamm	Eigenschaft	Herkunft
C57BL/6	Wildtyp	Charles River, Wilmington, USA
Ras (Kras <sup>V12G</sup> )	Transgen, onkogenes Kras <sup>V12G</sup> unter der Kontrolle des murinen Villin-Promotors (Expression im Darmepithel)	Institut Curie, Paris, Frankreich
Apc (Apc <sup>1638N</sup> )	Knock-in im Tumorsuppressorgen Apc, Allel Apc <sup>1638N</sup>	LUMC, Leiden, Niederlande
Cre (pVillinCre)	Transgen, Rekombinase Cre unter der Kontrolle des murinen Villin-Promotors (Expression im Darmepithel)	Institut Curie, Paris, Frankreich
Akt (tmaAkt/Z)	Transgen, aktivierte Form der Kinase Akt, mit gefloxter Stop-Kassette	Universität Texas, Dallas, USA
DN-Bcat (A33 <sup>DN-Bcat</sup> )	Beta-Catenin Knock-in im A33-Lokus (Beta-Catenin mit FLAG-Tag und N-terminaler Deletion, Expression im Darmepithel)	Ludwig Institut Melbourne, Australien
Neo (A33 <sup>Neo</sup> )	Neomycin-Resistenz Kassette im A33-Lokus (Expression im Darmepithel)	Ludwig Institut Melbourne, Australien

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Antikörper für Immunoblot

Erstantikörper	Herkunft	Verdünnung	Verwendeter Puffer	Referenz
Alpha-Tubulin	Maus	1:1000	5% Magermilch/TBST	Calbiochem
Akt	Kaninchen	1:1000	5% BSA/TBST	Cell Signaling
Bax	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST	BD
Bcl <sub>2</sub>	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST	BD
Bcl <sub>x</sub>	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST	BD
Beta-Catenin	Maus	1:4000	5% Magermilch/TBST	BD
Caspase 3	Kaninchen	1:2000	5% Magermilch/TBST	Cell Signaling
Cleaved Caspase 3	Kaninchen	1:2000	5% Magermilch/TBST	Cell Signaling
Cryptidin	Schaf	1:4000	5% Magermilch/TBST	A. Ouellette
E-Cadherin	Ratte	1:1000	5% Magermilch/TBST	Calbiochem
Flag-Tag	Kaninchen	1:500	5% Magermilch/TBST	Dianova
HA-Tag	Maus	1:1000	5% Magermilch/TBST	Cell Signaling
Lamin	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST	Cell Signaling
MMP7	Kaninchen	1:5000	5% Magermilch/TBST	Calbiochem
p70 S6 Kinase	Kaninchen	1:1000	5% BSA/TBST	Cell Signaling
P-Akt (Ser 473)	Kaninchen	1:1000	5% BSA/TBST	Cell Signaling
P-p70 S6 Kinase	Kaninchen	1:1000	5% BSA/TBST	Cell Signaling
<b>Zweitantikörper</b>				
Maus-HRP	Ziege	1:4000	-	Dianova
Kaninchen-HRP	Ziege	1:2000	-	Dianova
Ratte-HRP	Ziege	1:1000	-	Dianova
Schaf-HRP	Esel	1:2000	-	Dianova

### 2.1.6.2 Antikörper für Immunpräzipitation

Antikörper	Herkunft (Spezies)	Menge	Sepharose	Referenz
Beta-Catenin	Maus (IgG1)	2 µg	Protein G	BD
E-Cadherin	Ratte (IgG2a)	2 µg	Protein G	Calbiochem
Flag-Tag	Kaninchen	2 µg	Protein A	Dianova

### 2.1.6.3 Reagenzien für Immunfluoreszenz

Reagenz	Herkunft (Spezies)	Verdünnung	Fixierung	Referenz
Beta-Catenin	Maus	1:300	PFA, aufkochen	BD

Cox2	Kaninchen	1:100	PFA	Santa Cruz
CD31 (PECAM)	Ratte	1:2	Methanol	Sigma
Dapi	-	1:1000	PFA/Methanol	Sigma
Ki67	Kaninchen	1:300	PFA	Dako
Lysozym	Kaninchen	1:200	PFA	Dako
Tenascin-C, -W	Kaninchen	1:200	PFA	G. Orend, Basel
TRITC-Phalloidin	-	1:350	PFA/Methanol	Sigma
TRITC-UEA	-	1:2000	PFA	Sigma
VWF	Kaninchen	1:100	PFA	Chemicon
<b>Zweitantikörper</b>				
Maus-Cy3	Ziege	1:300	-	Dianova
Maus-A488	Ziege	1:300	-	Dianova
Kaninchen-Cy3	Ziege	1:300	-	Dianova
Kaninchen-A488	Ziege	1:300	-	Dianova
Ratte-Cy3	Ziege	1:200	-	Dianova

#### 2.1.6.4 Antikörper für Immunhistochemie

Erstantikörper	Herkunft (Spezies)	Verdünnung	Referenz
Osteopontin	Kaninchen	1:20	RD

#### 2.1.7 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert. Alle Primer sind in 5' -> 3' Richtung angegeben. Die Größe des PCR-Produktes steht in Klammern. wt = Wildtyp Allel, mut = mutiertes Allel.

##### 2.1.7.1 Primer für die Genotypisierung

###### Bcat (600 bp (wt), 663 bp (mut))

- A33wt 5353: ACT GAG GTC CTG CCT TTG TC
- A33wt 5354: AGG AAG GGT CCT TTC AGT GG
- A33mut 4937: AAC ACG ATG ATA AGC TTG CC
- A33mut 4939: TCT CAT AAG TGT AGG TCC TC

###### Akt (900 bp)

- AKT TS392: GAC ACC AGA CCA ACT GGT ATT GG
- AKT TS393: GCA TCG AGC TGG GTA ATA AGC G

**Cre (200 bp)**

- Cre 198 as: CGC GAA CAT CTT CAG GTT CT
- 2kb seq: CAA GCC TGG CTC GAC GGC C

**Apc (200 bp (wt), 400 bp (mut))**

- APC-A2: TCA GCC ATG CCA ACA AAG TCA
- APC-C2: GGA AAA GTT TAT AGG TGT CCC TTC T
- APC-PN3: GCC AGC TCA TTC CTC CAC TC

**Ras (400 bp)**

- Ras 340 as: CTA GGA CCA TAG GTA CAT CCT C
- 2kb seq: CAA GCC TGG CTC GAC GGC C

**2.1.7.2 Primer für die RT-PCR****Beta-Aktin (100 bp)**

- $\beta$ -aktin/for: AGC CAG GTC CAG ACG CAG G
- $\beta$ -aktin/rev: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC

**Beta-Catenin (227 bp)**

- Bcat/for: GCT GAC CTG ATG GAG TTG GA
- Bcat/rev: GCT ACT TGC TCT TGC GTG AA

**CD44 (164 bp)**

- CD44/for: GTC TGC ATC GCG GTC AAT AG
- CD44/rev: GGT CTC TGA TGG TTC CTT GTT C

**C-myc (84 bp)**

- C-myc/for: TAG TGC TGC ATG AGG AGA CA
- C-myc/rev: GGT TTG CCT CTT CTC CAC AG

**Cox2 (274 bp)**

- Cox2/for: ACA CAC TCT ATC ACT GGC ACC
- Cox2/rev: TTC AGG GAG AAG CGT TTG C

**Cryptdin1 (198 bp)**

- Crypt1/for: AAG AGA CTA AAA CTG AGG AGC AGC
- Crypt1/rev: CGA CAG CAG AGC GTG TA

**CyclinD1 (97 bp)**

- CyclinD1/for: GCA CAA CGC ACT TTC TTT CCA

- CyclinD1/rev: CGC AGG CTT GAC TCC AGA AG

#### **DN-Beta-Catenin (102 bp)**

- DN-Bcat/for: GGA TTA CAA AGA CGA TGA TGA CAA GTT G
- DN-Bcat/rev: GTC AGC TCA GGA ATT GCA CGT G

#### **Hes1 (295 bp)**

- Hes1/for: ACA CCG GAC AAA CCA AAG AC
- Hes1/rev: GTC ACC TCG TTC ATG CAC TC

#### **Math1 (322 bp)**

- Math1/for: GAC CAC CAT CAC CTT CGC ACC G
- Math1/rev: AAC TCT CCG TCA CTT CTG TGG

#### **MMP7 (160 bp)**

- MMP7/for: GAG ATG TGA GCG CAC ATC AGT G
- MMP7/rev: GAT GTA GGG GGA GAG TTT TCC AGT

#### **Osteopontin (102 bp)**

- Osteopontin/for: GAG ACC GTC ACT GCT AGT ACA CA
- Osteopontin/rev: GAC TCC TTA GAC TCA CCG CTC TT

### **2.1.7.3 Primer für die LOH-PCR und Sequenzierung**

#### **p53**

- D11 Mit 4-1: CAG TGG GTC ATC AGT ACA GCA
- D11 Mit 4-2: AAG CCA GCC CAG TCT TCA TA
- D11 Mit 30-1: GCT GCT GAA CAA GTA GGG TC
- D11 Mit 30-2: CCG TCA TTG CTA AAG GGA AG

#### **Apc**

- D8 Mit 17-1: TCA GGC AGA TTC CAA GCA G
- D8 Mit 17-2: CTG TGG GTA GCC CAA GTC AT

#### **Kras (123 bp)**

- Kras/for: GCC TGC TGA AAA TGA CTG AG
- Kras/rev: CCT CTA TCG TAG GGT CGT AC

#### **Nras (118 bp)**

- Nras/for: GAC TGA GTA CAA ACT GGT GG
- Nras/rev: GGT AAG AAT CCT CTA TGG TG

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Isolierung von DNA für die Genotypisierung**

Die Mausschwanzproben wurden über Nacht in 500 µl „Mouse-Tail-Lysis“-Puffer (2.1.4) und 7,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56°C verdaut. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Proben für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 400 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst und bei 4°C gelagert.

#### **2.2.1.2 Isolierung von RNA**

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Pipettenspitzen und Geräte verwendet. Die Geräte wurden vor Gebrauch mit einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, oder mit einer 1N NaOH-Lösung behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren. Die RNA wurde kurzfristig bei -20°C oder langfristig bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung mit einem Photometer (Nanodrop Techn., Montchanin, USA).

Für die Isolierung von RNA wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und bei -80°C gelagerte Gewebeproben verwendet. Das Gewebe wurde im gefrorenen Zustand abgewogen (ca. 50-100 mg), mit 1 ml Trireagenz (je 100 mg Probe) versetzt, und anschließend mit einem Mixgerät (Ultra Turrax, MTM, Anzing) homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde 200 µl Chloroform (je 100 mg Probe) zugegeben und gut homogenisiert. Zur Abtrennung der RNA wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 500 µl Isopropanol (je 100 mg Probe) gefällt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde erneut bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde mit 50 µl (Probe < 70 mg) bzw. 100 µl (Probe > 70 mg) RNase-freiem H<sub>2</sub>O versetzt und 10 min bei 56°C gelöst.

#### **2.2.1.3 Isolierung von genomischer DNA und RNA**

Für die gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA wurde der Allprep Mini Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Dieser Kit wurde nur benutzt, wenn von dem entsprechenden Gewebe nur sehr geringe Mengen vorhanden waren (<30 mg). Das Gewebe wurde abgewogen und mit der vorgeschriebenen Menge RLT-Puffer versetzt und mit einem Handmixgerät (Xenox, Niersbach) homogenisiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde mit 100 µl EB-Puffer und die RNA mit 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung**

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte für PCR-Proben, die nach der Amplifizierung sequenziert wurden. Mehrere parallele PCR-Ansätze wurden vereinigt und nach Anleitung des Herstellers über Qiagen-Säulen aufgereinigt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) bzw. Medigenomix (Martinsried) durchgeführt.

#### **2.2.1.5 cDNA Synthese (Reverse Transkription)**

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dieses Verfahren beruht auf den aus der Replikation von Retroviren gewonnenen Erkenntnissen (Houts et al, 1979; Kotewicz et al., 1985; Gerard et al., 1986). Für die cDNA Synthese wurden Reagenzien der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Für einen 40 µl Ansatz wurden 2 µg RNA eingesetzt. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide, die sich an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagern. In einem ersten Schritt wurde die mRNA mit jeweils 1 µl 10 µM Oligo-dT- und Random-Primern für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Nach Zugabe von 8 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 1 µl Reverse Transkriptase (RevertAid H-minus M-Mulv) wurde die mRNA während einer einstündigen Inkubation bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurde. Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die RT-PCR eingesetzt.

#### **2.2.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1988) können definierte DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, amplifiziert werden. Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (annealing) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert, wobei aus einem Doppelstrang zwei neue synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. In einem 50 µl-Ansatz wurden 3 µl DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1,0 µl dNTPs (5 mM), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), jeweils 25 µM Primer „forward“ und „reverse“ und 2,0 µl Taq-Polymerase (1:4 verdünnt) gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 50 µl aufgefüllt. Im Allgemeinen wurde ein „Hotstart“ durchgeführt, d.h. die Taq-Polymerase wurde erst nach der anfänglichen Denaturierung (5 min bei 94°C) zum PCR-Ansatz gegeben. Der Reaktionszyklus wurde auf jedes Primerpaar abgestimmt und ist im folgenden für alle Reaktionen aufgeführt. Nach dem letzten Zyklus blieb das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf 72°C zur

vollständigen Verlängerung des PCR-Produktes. Anschliessend wurde auf 4°C heruntergekühlt, um das Reaktionsprodukt bis zur Weiterverarbeitung zu lagern.

PCR	Denaturierung	Annealing	Extension	Anzahl Zyklen
Akt <sup>1</sup>	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 120 s	35
Apc <sup>1</sup>	94°C, 30 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	35
Beta-Aktin <sup>2</sup>	94°C, 60 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s	30
Cre <sup>1</sup>	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	30
DN-Bcat wt <sup>1</sup>	95°C, 60 s	59°C, 60 s	72°C, 60 s	35
DN-Bcat mut <sup>1</sup>	94°C, 60 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s	35
Hes1 <sup>2</sup>	96°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 40 s	35
K-Ras <sup>3</sup>	94°C, 60 s	55°C, 120 s	72°C, 180 s	35
LOH	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 90 s	30
Math1 <sup>2</sup>	96°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 40 s	35
N-Ras <sup>3</sup>	94°C, 60 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s	35
Ras <sup>1</sup>	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	30

1 = PCR für Genotypisierung, 2 = RT-PCR, 3 = PCR für Sequenzierung genomischer DNA, LOH = Programm für „Loss of Heterozygosity“-PCR

### 2.2.1.7 Real-Time PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) erhält man mit Hilfe der Menge an gebildeter cDNA eine direkte quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das SYBR<sup>®</sup> Green System verwendet. Dabei handelt es sich um einen in die DNA interkalierenden Farbstoff. Durch dessen Bindung in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach einer bestimmten Zyklenzahl wird Fluoreszenz messbar (Ct-Wert; Ct = Threshold Cycle). Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt, wie auch die DNA-Menge, exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und setzt dies ins Verhältnis zu einem ubiquitär exprimierten Kontroll-Gen, erhält man eine quantitative Aussage. In einem 30 µl Ansatz wurden 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, je 1 µl Primer „forward“ bzw. „reverse“, 15 µl 2x Sybr-Green-Mastermix (Eurogentec, Belgien) und 10 µl cDNA (10 ng/µl) gemischt. Ein Reaktionszyklus umfasste die folgenden Schritte: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min, 95°C für 15 s und X°C für 1 min, wo bei die letzten beiden Schritte 40-mal durchlaufen wurden (X entspricht hierbei der primerspezifischen „Annealing“ Temperatur, die im Folgenden aufgeführt ist). Um die Spezifität der Fluoreszenz zu überprüfen, wurde nach dem Lauf zusätzlich der Schmelzpunkt der PCR-Produkte bestimmt. Der Reaktionszyklus dieser Dissoziationsreaktion umfasste die folgenden Schritte: 95°C für 15 s, X°C für 20 s und 95°C für 15 s. Die Reaktionen wurden mit dem ABI Prism™ 7300

Sequence Detector (Applied Biosystem, USA) durchgeführt und mit Hilfe des Programms Sequence Detection Software v.1.4 (Applied Biosystem, USA) ausgewertet.

<b>Primer</b>	<b>Annealing Temperatur</b>
Beta-Aktin	58-64°C
Bcat, CD44, Cmyc, Cox2, Cyclin D1, DN-Bcat, MMP7, Osteopontin	60°C
Cryptdin1	58°C

### **2.2.1.8 Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel**

Die PCR-Produkte wurden in 1%- bis 2%igen Agarosegelen (in TAE-Puffer, 2.1.4) aufgetrennt. Der Gel-Lösung wurden nach dem Aufkochen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer (2.1.4) gemischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker von Fermentas (St. Leon-Rot), entsprechend der zu erwartenden Produktgröße. Die DNA konnte nach Einbau des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden (Gel Doc XR System, Bio Rad, München).

### **2.2.1.9 Auftrennung von PCR-Produkten im Acrylamidgel**

Die Produkte der LOH-PCR (LOH: Loss of Heterozygosity) wurden auf ein 9% Acrylamidgel aufgetragen (Zusammensetzung: 7,3 ml H<sub>2</sub>O, 2,4 ml Acrylamid, 200 µl 1x TAE, 11 µl TEMED, 150 µl APS). Die Auftrennung erfolgte bei 60-80 V so lange, bis der Marker 2-3x durchgelaufen war. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert (Gel Doc XR System, Bio Rad, München).

## **2.2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Alle Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Gewebe wurde abgewogen, mit 100 µl (je 100 mg Gewebe) RIPA-Puffer (2.1.4), pH 7,4 lysiert und mit einem Dounce-Homogenisator (Wheaton, USA) aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe zur vollständigen Lyse für 10 min auf dem Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Dann wurden nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne bei 14.000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den in Lösung gebliebenen Proteinen wurde in 3x SDS-Puffer (2.1.4) aufgenommen, 5 min bei 95°C aufgeköcht und bei -20°C gelagert, bzw. direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **2.2.2.2 Immunpräzipitation**

Alle Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Protein A- bzw. G-Sepharose (50 µl je Probe) wurde 2x mit PBS und 2x mit RIPA-Puffer (2.1.4) gewaschen. Die entsprechenden Antikörper wurden zur Bindung an die Sepharose mit dieser 1 h auf dem Rotationsrad (Renner, Darmstadt) inkubiert. Die an Sepharose gebundenen Antikörper wurden zum Proteinlysat (400 µl) gegeben und für 2 h auf dem Rotationsrad inkubiert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert (14.000 rpm, 30 s) und der Überstand verworfen. Das Sepharose-Pellet wurde 3x mit RIPA-Puffer gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Die über die Antikörper an die Sepharose gebundenen Proteine wurden in 50 µl 1x SDS-Puffer (2.1.4) aufgenommen, 5 min bei 95°C aufgeköcht und bei -20°C gelagert, bzw. direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **2.2.2.3 Zellkernfraktionierung**

Um Proteine, die sich im Zellkern, an der Membran oder im Zytoplasma befinden, voneinander zu trennen, wurden Gewebeproben mit 100 µl (je 100 mg Gewebe) CLB-Puffer (2.1.4) resuspendiert. Der CLB-Puffer ist eine hypotonische Lösung, dadurch platzen die Zellen auf, während die Zellkerne erhalten bleiben. Nach 5 min auf Eis wurden die Zellen mittels eines Dounce-Homogenisators (Wheaton, USA) aufgeschlossen (50x douncen) und zentrifugiert (5 min, 3.000 rpm, 4°C), um den zytosolischen Überstand vom Kernpellet zu trennen. Die Kerne wurden in 800 µl TSE-Puffer (2.1.4) resuspendiert und erneut mittels Homogenisator (50x douncen) aufgeschlossen, um die Kernhülle zu lysieren. Ein nächster Zentrifugationsschritt (5 min, 3.000 rpm, 4°C) trennt die löslichen nukleären Proteine vom Kernpellet. Das Pellet wurde nochmals in 800 µl TSE Puffer gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer (2.1.4) und 50 µl 3x SDS-Puffer (2.1.4) aufgenommen. Der zytosolische Überstand wurde für 15 min bei 23.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um partikuläre Bestandteile und Membranen vom Zytoplasma zu trennen.

### **2.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β-Mercaptoethanol, das im SDS-Probenpuffer enthalten ist, reduziert Disulfidbrücken. Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich an die Hauptkette der Proteine an und kompensieren so Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen. Die Auftrennung im Polyacrylamid erfolgt daher hauptsächlich aufgrund der Masse der Proteine. Um eine optimale Auftrennung der Proteine im Gel zu erhalten, kann die Porengröße des Gels variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt. Die in den Vorschriften angegebenen Gel-Konzentrationen beziehen sich auf die Acrylamid-Konzentration im Gel. Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst im Sammelgel konzentriert und wandern dann ins Trenngel ein.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und nach der Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Platten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer (2.1.4) gefüllt. Die Proben wurden in 3x SDS-Probenpuffer (2.1.4) fünf Minuten aufgekocht, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden aufgetragen (Page Ruler, Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V (Sammelgel) bzw. 130 V (Trenngel), bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

Lösungen	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	13%	16%	5%
H <sub>2</sub> O	3,48 ml	2,98 ml	2,23 ml	1,48 ml	1,67 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid	2,00 ml	2,50 ml	3,25 ml	4,00 ml	0,50 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,86 ml	1,86 ml	1,86 ml	1,86 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	-	-	-	760 µl
10% SDS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	30 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	3 µl

### 2.2.2.5 Western-Blot (Immunoblot)

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin et al. (1979) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell) transferiert. Dies erfolgte in einer „semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (Bio Rad, München) zwischen in Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier bei 2,5 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche für 60 min. Anschließend wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation in 5% Milchpulver/TBST (2.1.4) für 1h bei RT abgesättigt.

### 2.2.2.6 Spezifischer Proteinnachweis mittels Immundetektion

Mit der nun folgenden Immundetektion konnten die immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgte dabei über zwei Antikörper. Der primäre Antikörper bindet spezifisch das zu detektierende Protein, während der sekundäre Antikörper als Markierung ein kovalent gebundenes Enzym (Meerrettich-Peroxidase, HRP) trägt, mit dessen Hilfe ein chromophores farbloses Substrat zu einem lichtemittierenden Stoff umgewandelt wird. Nach der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran, wurde diese mehrmals mit TBST (2.1.4) gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C (verdünnt in 5% Milchpulver bzw. BSA/TBST) inkubiert. Nach mehrmaligem

Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert und anschließend erneut mit TBST gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Detektionsreagenz (ECL: enhanced chemiluminescence, Pierce, Bonn). Dafür wurden die Detektionslösungen zu gleichen Teilen gemischt (1,5 ml pro Membran) und auf der Membran für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen eine Plastikfolie gelegt und die spezifischen Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham, Braunschweig) detektiert.

### **2.2.3 Immunhistochemie und Immuncytochemie**

#### **2.2.3.1 Kryoschnitte**

Das von der Maus entnommene Gewebe wurde in Acetatpuffer (Infusionslösung Deltajonin, Pfullingen) schockgefroren bzw. in TissueTek (Sakura; Niederlande) eingebettet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Kryostat (Leica, Wetzler) 6-8  $\mu\text{m}$  dick geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Kryoschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und entweder direkt für Färbungen verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.3.2 Paraffinschnitte**

Das von der Maus entnommene Gewebe wurde in Einbettkassetten (Roth, Karlsruhe) gelegt und zunächst in AFA-Fixierungspuffer fixiert. Das Entwässern, Einbetten in Paraffin und Ausgießen der Proben wurde im Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar unter Routinebedingungen durchgeführt. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Mikrotom 2  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen und bei Raumtemperatur gelagert.

#### **2.2.3.3 Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE)**

Für die histologische Beurteilung des Gewebes wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Zellkernfärbung) und Eosin (Zytoplasmafärbung) gefärbt. Dafür wurden die Objektträger zunächst 1 min in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und dann 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin folgte die 1-minütige Gegenfärbung mit Eosin. Nach kurzem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert. Zur Verdrängung des Alkohols wurden die Objektträger dann in Xylol inkubiert und anschließend in Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckelt. Die Paraffinschnitte mussten vor der HE-Färbung zunächst entparaffiniert werden (Xylol, absteigende Alkoholreihe).

#### **2.2.3.4 Immunfluoreszenz**

Für die spezifische Detektion von Proteinen wurden die Gewebeschnitte mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Dafür wurde das Gewebe zunächst mit 3% PFA für 20 min bzw. mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert (abhängig vom Antikörper) und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Für die Färbung mit dem Beta-Catenin Antikörper wurden die Schnitte zusätzlich für 10 min in 10 mM Citrat-Puffer aufgekocht (Epitop-Retrieval). Um das PFA vollständig zu inaktivieren wurden die Proben für 20 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bei RT inkubiert (nur bei PFA Fixierung). Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen durch 20-minütige Blockierung mit 2% BSA/PBS abgesättigt. Der primäre, in 2% BSA/PBS verdünnte Antikörper wurde dann für 1 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 2% BSA/PBS erfolgte dann die Bindung des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 1 h bei RT. Für die Färbung der Zellkerne wurde in diesem Schritt zusätzlich mit Dapi gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift der Schnitte wurden diese mit Gelatine eingedeckelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Jena) ausgewertet. Die Paraffinschnitte mussten vor der Immunfluoreszenzfärbung zunächst entparaffiniert (Xylol, absteigende Alkoholreihe) werden.

#### **2.2.3.5 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Färbung von Osteopontin wurden Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert (3x 5 min Xylol, 2x 10 min 100% Ethanol, 1x 10 min 96% Ethanol, 1x 5 min 70% Ethanol). Dann wurden die Schnitte 2x 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 20 min 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Nach erneuten Waschschriften (3x 5 min Leitungswasser, 2x 5 min ddH<sub>2</sub>O, 1x 5 min PBS) wurden die Schnitte für 20 min bei RT mit 5% Rattenserum geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (Osteopontin 1:20). Am folgenden Tag folgte nach 3x 5 min Waschen mit PBS die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-HRP) für 30 min bei RT. Die Peroxidaseaktivität wurde mit dem Envision+® System-HRP (Dako, USA) detektiert und für eine Kernfärbung für 5 min mit Hämatoxylin gegen gefärbt. Die fertigen Schnitte wurden mit Gelatine eingedeckelt und mit dem Mikroskop (Axiolab, Zeiss, Jena) analysiert.

#### **2.2.3.6 Fixierung und Färbung des Maudarms**

Zur Entnahme von Gewebe aus Mäusen wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsbereiches mit 70% Ethanol steril entnommen. Für die makroskopische Untersuchung des Darmepithels wurde der Darmtrakt longitudinal aufgeschnitten und mit der Innenseite nach oben auf Styropor mit Nadeln befestigt. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C in AFA-Fixierungspuffer (2.1.4). Danach wurde der Darm für 2 min mit 0,2% Methylenblau gefärbt, um die Oberfläche des Darms kontrastreicher darzustellen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS konnte das Darmepithel unter dem Mikroskop (Stemi 2000-C, Zeiss, Jena) analysiert werden.

### **2.2.3.7 X-Gal Färbung**

Zum Nachweis der Expression der Beta-Galaktosidase wurde das entsprechende Gewebe für 1 h bei 4°C mit X-Gal-Fixierungspuffer (2.1.4) fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Die enzymatische Reaktion (Beta-Galaktosidase setzt X-Gal in ein blaues Produkt um) erfolgte über Nacht bei 37°C in X-Gal-Färbepuffer (2.1.4). Die gefärbten Gewebe wurden danach noch einmal mit PBS gewaschen und mikroskopiert bzw. fotografiert. Das Gewebe wurde dann für 4 h bei 4°C in 1% PFA nachfixiert und in Acetatpuffer (Infusionslösung Deltajonin, Pfullingen) eingefroren, um anschließend Kryoschnitte von diesem Gewebe zu machen.

### **2.2.4 Primärkultur**

Für das Anlegen von Primärkulturen wurde Normalgewebe (Alter der Tiere max. 4 Wochen) oder Tumorgewebe aus dem Darm der Maus entnommen. Das Gewebe wurde in Tissue-Collection-Medium (2.1.4) gelegt, mit zwei sterilen Skalpellenspitzen zerkleinert und mit 5 ml Digestion-Medium (2.1.4) für 2-5 h (je nach Verdauungszustand) bei 37°C geschüttelt. Nach ausreichendem Verdau wurden die Zellen bei 400 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 2x mit 5 ml Waschmedium (2.1.4) gewaschen (Zentrifugation 400 rpm, 5 min; Überstand verworfen) und anschließend in Main-Culture-Medium (2.1.4) aufgenommen. Die Zellen wurden auf mit 0,1% Gelatine/PBS vorbehandelte Deckgläser ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert. Für die Immunfluoreszenz Analyse der Primärkulturen wurden die Zellen zunächst mit 3% PFA für 20 min fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Um das PFA vollständig zu inaktivieren wurden die Zellen für 20 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen durch 20-minütige Blockierung mit 2% BSA/PBS abgesättigt. Der primäre, in 2% BSA/PBS verdünnte Antikörper wurde dann für 1 h bei RT auf den Deckgläsern inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 2% BSA/PBS erfolgte dann die Bindung des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 1 h bei RT. Für die Färbung der Zellkerne wurde in diesem Schritt zusätzlich mit Dapi gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser mit 90% Glycerin/10% PBS auf einen Objektträger übertragen und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Jena) ausgewertet.

### **2.2.5 Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Auftauen, Einfrieren und Passagieren der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen.

### **2.2.6 Tamoxifen Injektion**

Für die Aktivierung der transgenen Akt-Kinase in CreAkt-Mäusen wurde diesen 3x 5 Tage (dazwischen 9 Tage ohne Injektion) i.p. mit 1 mg Tamoxifen injiziert.

### **2.2.7 Radioaktive Bestrahlung**

Für die Induktion von Apoptose in Mäusen wurden diese einmalig mit einer Dosis von 10 Gray radioaktiv bestrahlt ( $\text{Cs}^{137}$  Bestrahlungsgerät, Buchler, Braunschweig). Anschließend wurden die Mäuse analysiert oder beobachtet (Überlebenskurve). Bei Anzeichen von Morbidität wurden die Tiere aus ethischen Gründen geopfert.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

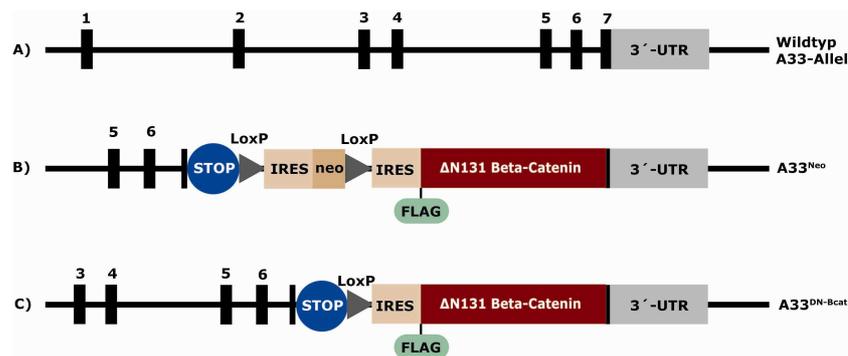
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Student's t-Test für gepaarte Daten (GraphPad PRISM®, Version 4.02). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen sind signifikant, wenn  $p < 0,05$ , d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Projekt I: Einfluss von onkogenem $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung

##### 3.1.1 A33<sup>DN-Bcat</sup>-Maus

Die A33<sup>DN-Bcat</sup>-Maus (im Folgenden als „Bcat-Maus“ bezeichnet) exprimiert eine onkogene Form von  $\beta$ -Catenin mit einer N-terminalen Deletion von 131 Aminosäureresten. Dadurch kann das transgene  $\beta$ -Catenin nicht mehr durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert und anschließend abgebaut werden. Ähnliche Mutationen treten in 5-10% der menschlichen Kolonkarzinome auf (Polakis, 2000). Die Bcat-Maus wurde von Matthias Ernst (Ludwig Institut, Melbourne) durch eine Knock-in-Strategie generiert: Die bizistronische RNA von amino-terminal verkürztem  $\beta$ -Catenin ( $\Delta$ N131) mit amino-terminal angehängtem Flag-Tag (Affinitäts-Sequenz aus acht Aminosäureresten (DYKDDDD-DK) zum leichteren Nachweis von Fusionsproteinen), wurde in den A33 Genlocus eingefügt. Das A33-Antigen ist ein Transmembranprotein, das spezifisch an der basolateralen Membran der Darmepithelzellen exprimiert wird (Heath et al., 1997; Johnstone et al., 2000). Ein Knock-in im A33 Genlocus erlaubt somit die spezifische Expression des Transgens in den Zellen des Darmepithels. Eine LoxP (LoxP: locus of crossing over) flankierte Neo-Kassette (Neomycin-Resistenzgen) wurde vor das Transgen kloniert, um die Expression des deletierten  $\beta$ -Catenins zu verhindern. Die Mäuse, die dieses nicht rekombinierte Allel tragen, wurden als A33<sup>Neo</sup>-Mäuse (Neo-Maus) bezeichnet und sollen als Kontrolltiere dienen. Wird die Neo-Maus mit einer Cre-Deleter-Maus gekreuzt, die eine Expression der Rekombinase in der Keimbahn aufweist, so wird die Neo-Kassette über die LoxP-Sequenzen herausgeschnitten und es kommt zur transkriptionellen Aktivierung des Transgens (Abb.3.1). Das Cre/loxP-System ist ein Rekombinations-System, das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt, und mit den DNA-Sequenzen gezielt entfernt oder rekombiniert werden können. LoxP-Sequenzen sind spezifische Basensequenzen der DNA, die von der Cre-Rekombinase (Cre: causes recombination) erkannt und geschnitten werden. Die Bcat-Maus wurde in dem hier vorliegenden Projekt zum ersten Mal zur Analyse der Wnt-Signaltransduktion eingesetzt, und wurde daher eingehend im Hinblick auf die Expression des Transgens charakterisiert (siehe folgende Abschnitte).

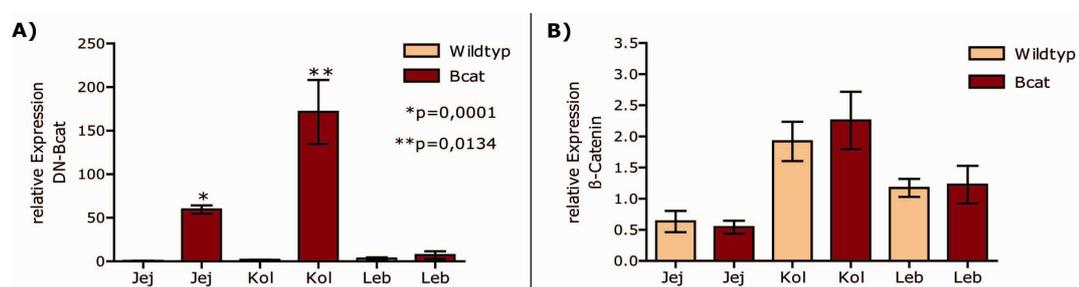


**Abb.3.1: Knock-in Konstrukt der Bcat-Maus**

Details siehe Text. Stop: Stop-Kassette, IRES: Internal Ribosomal Entry Site, Neo: Neomycin-Resistenz-Kassette, UTR: Untranslated Region, 1-7: Exons des A33 Gens. **(A)** Wildtyp-Allel. **(B)** Nicht rekombiniertes Allel: Neo-Maus. **(C)** Rekombiniertes Allel: Bcat-Maus.

### 3.1.1.1 Transgenes $\beta$ -Catenin wird spezifisch im Darm von Bcat-Mäusen exprimiert

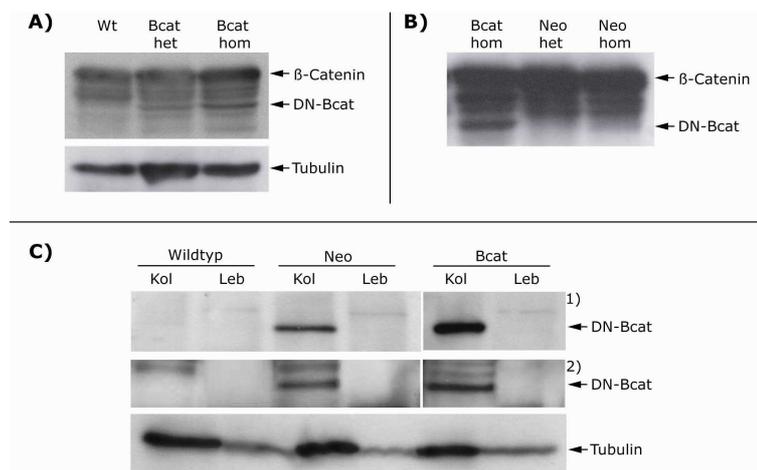
Bcat-Mäuse sind lebensfähig, haben keinen auffälligen Phänotyp, und Nachkommen entstehen in der normalen Mendelschen Frequenz. Um die spezifische Expression des transgenen  $\beta$ -Catenins (im Folgenden als „DN-Bcat“ bezeichnet) zu überprüfen, wurden qRT-PCR (quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction) Experimente von verschiedenen Geweben aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen durchgeführt (Abb.3.2). DN-Bcat wurde signifikant im Darmgewebe von Bcat-Mäusen exprimiert, während in den Wildtyp-Tieren keine Expression detektiert werden konnte. Die Expression war im Kolon stärker als im Dünndarm und war gewebe-spezifisch, da in der Milz, der Niere und der Leber kein DN-Bcat nachweisbar war (Abb.3.2A). Die Mengen an endogenem  $\beta$ -Catenin waren nicht verändert, d.h. die Expression des endogenen  $\beta$ -Catenin wird nicht durch die Transkription des transgenen  $\beta$ -Catenins beeinflusst (Abb.3.2B).



**Abb.3.2: Nachweis der spezifischen Expression von DN-Bcat auf RNA-Ebene**

Bestimmung der mRNA Expression durch qRT-PCR in Jejunum (Jej), Kolon (Kol) und Leber (Leb) von Wildtyp- und Bcat-Mäusen (n=5). Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression aller Wildtyp Jejunum- bzw. Kolon-Proben normalisiert (1,0). Alle Proben wurden zweifach gemessen. **(A)** Die Expression von DN-Bcat in Bcat-Mäusen ist im Vergleich zum Wildtyp hochsignifikant im Jejunum ( $p=0,0001$ ) und signifikant im Kolon ( $p=0,0134$ ). DN-Bcat wird nicht in der Leber exprimiert. **(B)** Die Mengen an endogenem  $\beta$ -Catenin sind in Wildtyp- und Bcat-Mäusen gleich.

Auch auf Proteinebene konnte eine gewebsspezifische Expression des transgenen  $\beta$ -Catenins nachgewiesen werden (Abb.3.3). Endogenes  $\beta$ -Catenin (90 kDa) wurde in allen Mäusen gleich stark exprimiert. Die Expression von DN-Bcat (ca. 70 kDa) war abhängig von der Gendosis; in homozygoten Bcat-Mäusen wurde im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistern mehr DN-Bcat exprimiert (Abb.3.3A). In den Neo-Mäusen konnte dagegen im Immunoblot keine DN-Bcat Bande detektiert werden (Abb.3.3B). Durch Immunpräzipitation mit einem  $\beta$ -Catenin- oder Flag-spezifischen Antikörper wurde die spezifische Expression von DN-Bcat im Kolon bestätigt. In der Leber war DN-Bcat nicht nachweisbar. Allerdings wurde in diesem Experiment eine Expression des Transgens in den Neo-Mäusen nachgewiesen (Abb.3.3C). Die Neo-Mäuse sollten als Kontrolltiere verwendet werden, die kein DN-Bcat exprimieren. Die Immunpräzipitation zeigte aber, dass trotz Neo-Kassette eine schwache Expression des Transgens vorhanden war. Aus diesem Grund wurden die Neo-Mäuse nicht mehr als Kontrolltiere verwendet, und die Bcat-Mäuse in allen folgenden Versuchen mit Wildtyp-Tieren verglichen.

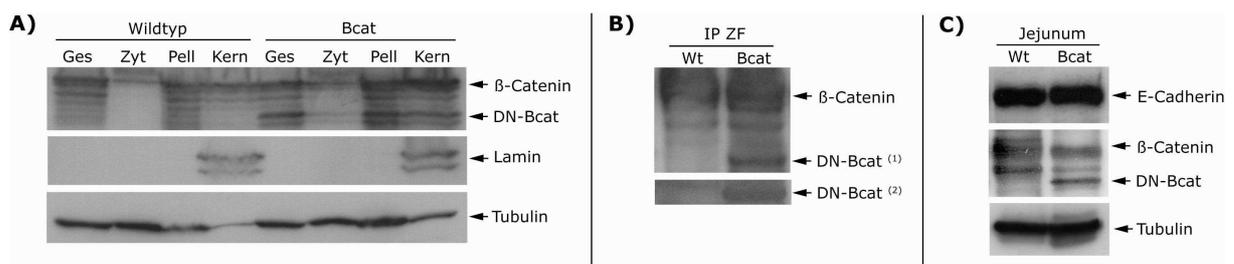


### Abb.3.3: Nachweis der spezifischen Expression von DN-Bcat auf Proteinebene

Western-Blot Analyse (WB) von verschiedenen Geweben aus Wildtyp-, Neo- und Bcat-Mäusen. Tubulin: Ladekontrolle (55 kDa) **(A)** Gesamtproteinlysate aus dem Jejunum von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Bcat-Mäusen. Die Mengen an endogenem  $\beta$ -Catenin (90 kDa) sind gleich. DN-Bcat (ca. 70 kDa) wird in Bcat-Mäusen gendosisabhängig exprimiert und ist in Wildtyp-Mäusen nicht nachweisbar. Bcat het =  $A33^{DN-Bcat/wt}$ , Bcat hom =  $A33^{DN-Bcat/DN-Bcat}$ . **(B)** Gesamtproteinlysate aus dem Jejunum von Bcat- und Neo-Mäusen. DN-Bcat ist im Gesamtlysate von heterozygoten und homozygoten Neo-Mäusen nicht nachweisbar. Bcat hom =  $A33^{DN-Bcat/DN-Bcat}$ , Neo het =  $A33^{Neo/wt}$ , Neo hom =  $A33^{Neo/Neo}$ . **(C)** Immunpräzipitation (IP) mit anti-Flag (1) und anti- $\beta$ -Catenin Antikörper von Kolon- (Kol) und Leber- (Leb) Lysaten von Wildtyp-, Neo- und Bcat-Mäusen. DN-Bcat ist nach Immunpräzipitation im Kolon von Neo- und Bcat-Mäusen nachweisbar, nicht aber im Wildtyp- und Kontrollgewebe (Leber). Die Menge an präzipitiertem DN-Bcat ist in Neo-Mäusen schwächer als in Bcat-Tieren. 1) IP = Flag, WB =  $\beta$ -Catenin, 2) IP =  $\beta$ -Catenin, WB = Flag.

### 3.1.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von DN-Bcat

Nachdem die spezifische Expression von DN-Bcat bestätigt wurde, sollte überprüft werden, ob das transgene  $\beta$ -Catenin in den Kern translozieren kann, was für die transkriptionelle Aktivierung des Wnt-Signalweges unabdingbar ist. Dafür wurde eine subzelluläre Fraktionierung von Jejunum-Proben aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen durchgeführt (Abb.3.4). DN-Bcat war sowohl in der zytosolischen, als auch in der Kernfraktion von Bcat-Mäusen nachweisbar (Abb.3.4A). Eine Immunpräzipitation der Kernfraktion mit einem anti- $\beta$ -Catenin Antikörper bestätigte zusätzlich die Lokalisierung von DN-Bcat im Zellkern (Abb.3.4B). Weiterhin konnte DN-Bcat mit einem anti-E-Cadherin Antikörper immunpräzipitiert werden (Abb.3.4C). DN-Bcat ist also in der Lage, E-Cadherin an der Membran zu binden. Dieser Befund stimmt gut mit der vorhergesagten Struktur des transgenen DN-Bcat überein, da die amino-terminale Deletion nicht die Bindungsstelle von E-Cadherin betrifft (Abb.1.1; Ramagnolo et al., 1999; Orner et al., 2002). Die Adhäsion *in vivo* wird jedoch durch die Expression von DN-Bcat vermutlich nicht beeinflusst, da keine auffälligen Störungen in der Struktur der Darmepithelzellen in Bcat-Mäusen beobachtet wurden.



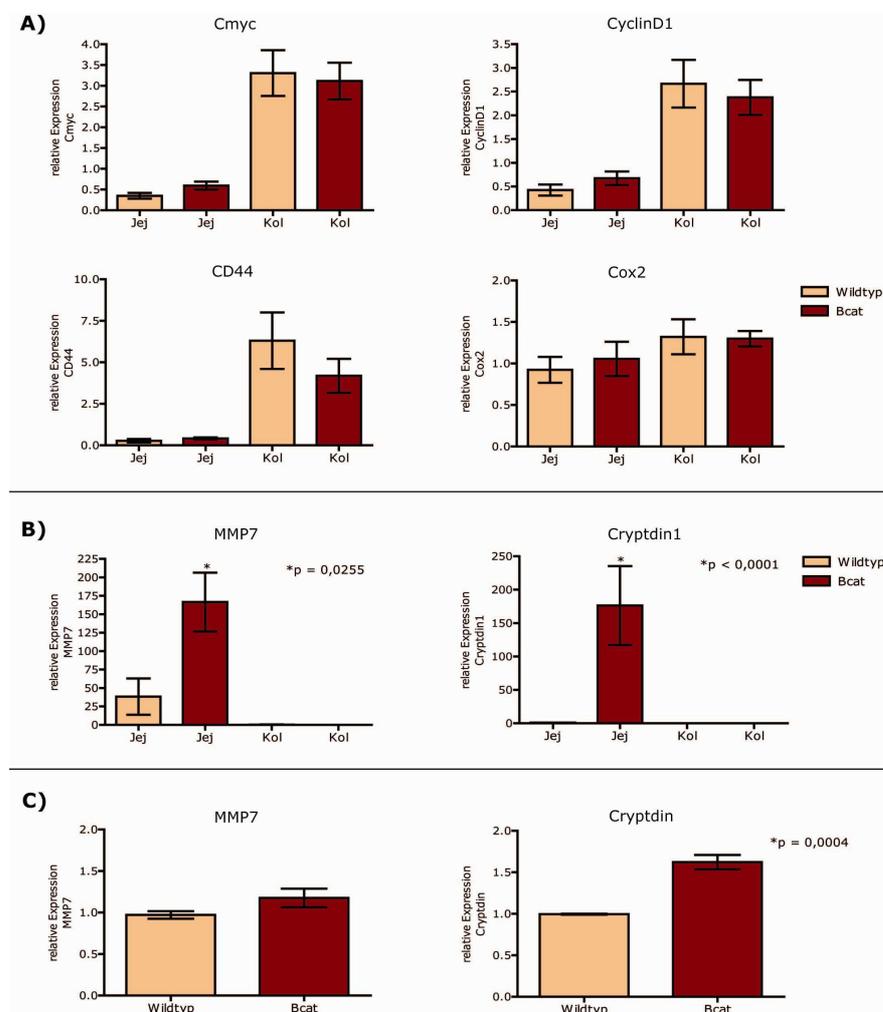
**Abb.3.4: DN-Bcat ist im Zellkern und an der Zellmembran lokalisiert**

Western-Blot Analyse von Kernfraktionierung und Immunpräzipitation von Jejunum-Proben aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen. **(A)** Kernfraktionierung. Ges: Gesamtproteinlysat, Zyt: Zytoplasmatische Fraktion, Pell: Pellet, Kern: Zellkernfraktion. Tubulin (55 kDa) und Lamin A/C (70 kDa) als Negativ- und Positivkontrolle für die Kernfraktion. Endogenes  $\beta$ -Catenin befindet sich an der Membran (Pell) und im Zellkern. Auch DN-Bcat (70 kDa) ist im Zellkern und an der Membran (Pell) lokalisiert. **(B)** Im Anschluss an die subzelluläre Fraktionierung wurde eine Immunpräzipitation mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper an der Kernfraktion (ZF) durchgeführt. 1) Western-Blot mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper, 2) Western-Blot mit anti-Flag Antikörper. Endogenes  $\beta$ -Catenin (90 kDa) und DN-Bcat (70 kDa) sind im Zellkern lokalisiert. **(C)** Immunpräzipitation von E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und DN-Bcat mit anti-E-Cadherin Antikörper. Tubulin: Ladekontrolle (Gesamtlysat) (55 kDa), Wt: Wildtyp. DN-Bcat (70 kDa) bindet wie endogenes  $\beta$ -Catenin (90 kDa) an E-Cadherin (130 kDa).

### 3.1.1.3 Aktivierung von Wnt-Zielgenen durch DN-Bcat

Um zu überprüfen, ob das im Zellkern lokalisierte DN-Bcat in der Lage ist, die Transkription von Wnt-Zielgenen zu aktivieren, wurden qRT-PCR Analysen von Jejunum- und Kolon-Proben aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen durchgeführt (Abb.3.5). Überraschenderweise waren die „klassischen“ Wnt-Zielgene wie *Cmyc*, *CyclinD1*, *CD44* und *Cox2* (Clevers, 2006) in Bcat-Mäusen nicht verstärkt

exprimiert (Abb.3.5A). Im Gegensatz dazu war die mRNA von MMP7 (Matrixmetalloproteinase 7) und Cryptdin1 signifikant in Bcat-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht. Sowohl MMP7 als auch Cryptdin1 waren nur im Dünndarm, nicht aber im Kolon von Mäusen nachweisbar (Abb.3.5B). Die Quantifizierung von Proteinlysaten durch Western-Blot Analysen von Jejunum aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen bestätigten diese Beobachtungen auf Proteinebene. Die Proteinexpression von MMP7 (allerdings nicht signifikant) und Cryptdin (hochsignifikant,  $p = 0,0004$ ) waren im Dünndarm von Bcat-Mäusen erhöht (Abb.3.5C). MMP7 wird in 80% der humanen Kolonrektaltumore überexprimiert, und ist bekannt als wichtiger Faktor für das frühe Tumorwachstum, aber auch verantwortlich für spätere Schritte in der Progression, wie Invasion und Metastasierung (Brabletz et al., 1999). Cryptdin1 gehört zur Familie der alpha-Defensine, die anti-mikrobielle Substanzen darstellen. Die Cryptdin Vorläuferproteine werden in den Panethzellen durch MMP7 aktiviert. MMP7 und Cryptdin werden im Dünndarm nur in den Panethzellen exprimiert (Shirafuji et al., 2003).



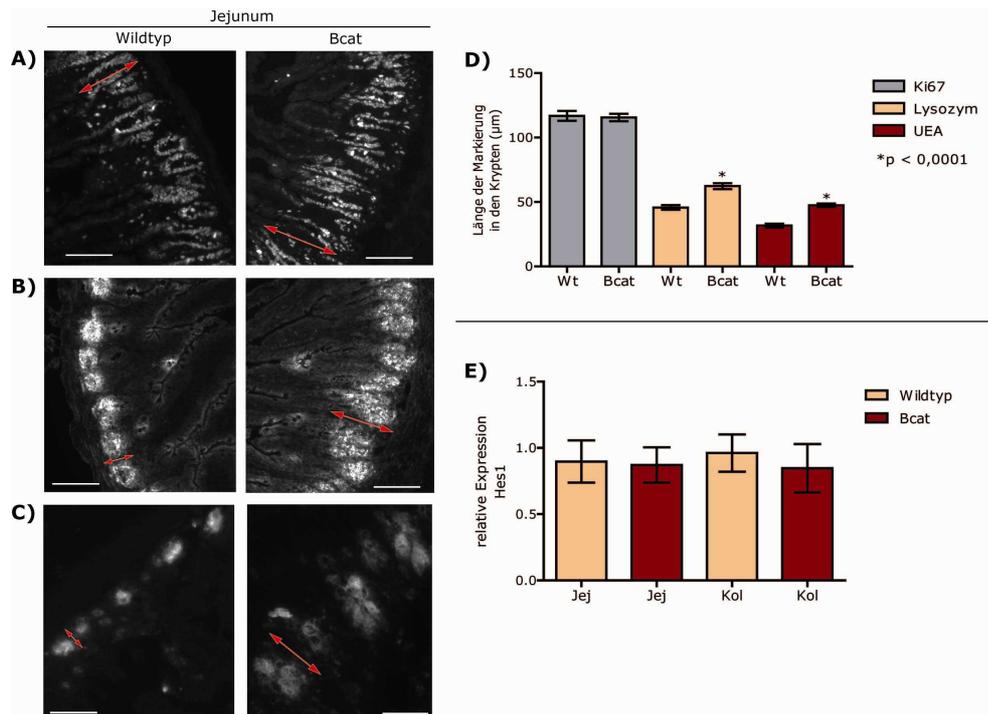
**Abb.3.5: MMP7 und Cryptdin, nicht aber die „klassischen“ Wnt-Zielgene, sind im Jejunum von Bcat-Mäusen überexprimiert**

**(A+B)** Bestimmung der mRNA Expression durch qRT-PCR in Jejunum- (Jej) und Kolon-Proben (Kol) aus Wildtyp- (n=5) und Bcat- (n=12) Mäusen. Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression aller

Wildtyp Jejunum- bzw. Kolon-Proben normalisiert (1,0). Alle Proben wurden zweifach gemessen. **(A)** Relative Expression der mRNA von *Cmyc*, *CyclinD1*, *CD44* und *Cox2*. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der transkriptionellen Aktivierung dieser Gene zwischen Wildtyp- und *Bcat*-Mäusen. **(B)** Expression der *MMP7* und *Cryptdin1* mRNA. *Cryptdin* ( $p < 0,0001$ ) und *MMP7* ( $p = 0,0255$ ) sind signifikant erhöht im Jejunum von *Bcat*-Mäusen. Beide Gene werden im Kolon nicht exprimiert. **(C)** Quantifizierung von Western-Blots von Wildtyp- und *Bcat*-Proteinlysaten. *Cryptdin* ( $p = 0,0004$ ) ist im Dünndarm von *Bcat*-Mäusen überexprimiert; *MMP7* zeigt dagegen keine signifikanten Expressions-Veränderungen. Wildtyp-Mäuse:  $n=10$  (*MMP7*),  $n=4$  (*Cryptdin*); *Bcat*-Mäuse:  $n=16$  (*MMP7*),  $n=8$  (*Cryptdin*).

#### **3.1.1.4 Verstärkte Expression von Panethzellmarkern im Dünndarm von *Bcat*-Mäusen**

Da der Wnt-Signalweg die Differenzierung beeinflusst (Van Es et al., 2005), sollte untersucht werden, ob die erhöhte *MMP7* und *Cryptdin* Expression die Folge einer erhöhten Anzahl von Panethzellen ist. Dafür wurden verschiedene Panethzellmarker im Dünndarm von Wildtyp- und *Bcat*-Mäusen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft (Abb.3.6). UEA (*Ulex europaeus* Agglutinin) ist ein Lektin und bindet an die L-Fucose in den Becher- und Panethzellen. Lysozym wird in den sekretorischen Granula der Panethzellen gebildet. Während die Zahl der proliferierenden Zellen in Wildtyp- und *Bcat*-Mäusen vergleichbar war (Abb.3.6A), fand man in den Krypten der *Bcat*-Tiere eine vermehrte Anzahl von mit Lysozym und UEA markierten Zellen (Abb. 3.6B,C). Eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale (Ausmessen der Länge der markierten Krypten, vgl. rote Pfeile in 3.6A-C) zeigte, dass die Anzahl von Zellen, die positiv mit den Panethzellmarkern markiert waren, im Dünndarm von *Bcat*-Mäusen in der Tat signifikant erhöht war (Abb.3.6D). Die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin verlagert also die Differenzierung der Zellen in Richtung Panethzellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien. So führt der Funktionsverlust von *Apc* (Wnt-Aktivierung) zur verstärkten Differenzierung in Panethzellen (Van Es et al., 2005), und auch in humanen Kolorektaltumoren werden vermehrt Panethzellmarker exprimiert. Es ist bekannt, dass der Notch-Signalweg einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung hat, der komplementär zur Rolle des Wnt-Signalweges ist (Zecchini et al., 2005; de Lau et al., 2007). Es konnten jedoch in qRT-PCR Experimenten keine Veränderungen in der Expression der Notch-Zielgene *Hes1* und *Math1* (nicht gezeigt) nachgewiesen werden (Abb.3.6E).



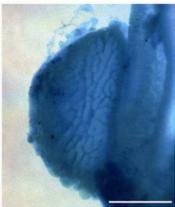
### Abb.3.6: Erhöhte Anzahl von Panethzellen in den Krypten von Bcat-Mäusen

(A-C) Immunfluoreszenz von Kryoschnitten von Jejunum aus Wildtyp- und Bcat-Mäusen. Dargestellt ist der Bereich der Krypten. (A) 100-fache Vergrößerung; Maßstab = 100 µm. Markierung der proliferierenden Zellen mit anti-Ki67 Antikörper. Keine veränderte Proliferationsrate in Bcat-Mäusen. (B) 100-fache Vergrößerung; Maßstab = 100 µm. Markierung der Panethzellen mit Lysozym. In den Bcat-Mäusen sind mehr Zellen in den Krypten positiv gefärbt. (C) 200-fache Vergrößerung; Maßstab = 50 µm. UEA markierte Panethzellen. Vermehrte UEA-Färbung in den Krypten der Bcat-Mäuse. (D) Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale (A-C). Die Länge der markierten Krypten (rote Pfeile in A-C) wurde ausgemessen (je 40 Krypten von drei unterschiedlichen Schnitten/Mäusen). In Bcat-Mäusen ist die Anzahl der Panethzellen hochsignifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ), während die Proliferation (Ki67) nicht beeinflusst ist. (E) Bestimmung der Expression von Hes1 mRNA durch RT-PCR in Jejunum (Jej), und Kolon (Kol) von Wildtyp- und Bcat- (n=3) Mäusen. Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression aller Wildtyp Jejunum- bzw. Kolon-Proben normalisiert (1,0). Keine Unterschiede in der Hes1 Expression im Darm von Wildtyp- und Bcat-Mäusen.

#### 3.1.1.5 DN-Bcat induziert die Tumorgenese

Um zu untersuchen, ob DN-Bcat in der Lage ist, die Entstehung von Tumoren zu initiieren, wurde der Darm von Bcat-Mäusen mit unterschiedlichem Alter analysiert und mit Wildtyp- und Neo-Tieren verglichen (Abb.3.7). Wildtyp-Mäuse (n=18) wiesen wie erwartet keine Läsionen im Darm auf, während Bcat-Tiere (homozygot n=26; heterozygot n=22) im Schnitt 0,4 makroskopisch erkennbare Läsionen pro Tier zeigten (Abb.3.7A). Die meisten dieser Tumore waren Mikroadenome, die im Kolon lokalisiert waren (82% in homozygoten Tieren) (Abb.3.7B). Jedoch konnten in älteren Mäusen (älter als 22 Monate) auch einige Adenome im Dünndarm detektiert werden. Die entstandenen Tumore waren relativ klein (1,9 bis 2,7 mm Durchmesser).

Interessanterweise korrelierte die Inzidenz mit der dosisabhängigen Expression von DN-Bcat. In homozygoten Bcat-Mäusen war die Entstehung von Tumoren häufiger (35%) als in heterozygoten Tieren (23%). Angemerkt sei auch, dass die Neo-Mäuse (n=23), welche ebenfalls, wenn auch schwach, DN-Bcat exprimieren, mit entsprechender Inzidenz Tumore entwickelten (17%) (Abb.3.7A). In einer homozygoten, 23 Monate alten Bcat-Maus wurde im Duodenum ein Lymphom (ca. 4-5 mm Durchmesser) gefunden, das allerdings von der weiteren Analyse der Tumore ausgeschlossen wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bcat-Mäuse eine signifikante spontane Tumorentstehung im Darm aufweisen, aber die Inzidenz gering ist und die meisten Läsionen sehr klein und in einem frühen Stadium sind. Daraus lässt sich schliessen, dass die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin für die Tumorentstehung ausreichend ist, aber nicht für die weitere Tumorentstehung ausreicht.

A)	Genotyp	Anzahl Mäuse	Alter (Monate)	Anzahl Tumore	Inzidenz	Tumore pro Maus	Tumorgröße (mm)	Lokalisation Tumore		B)
								Dünndarm	Kolon	
	Wt	18	8	0	0%	0,0	0,0±0,00	0%	0%	
	Neo	23	16	5	17%	0,2	1,0±0,61	0%	100%	
	Bcat het	22	17	8	23%	0,4	2,7±1,86	62%	38%	
	Bcat hom	26	15	11	35%	0,4	1,9±1,75	18%	82%	

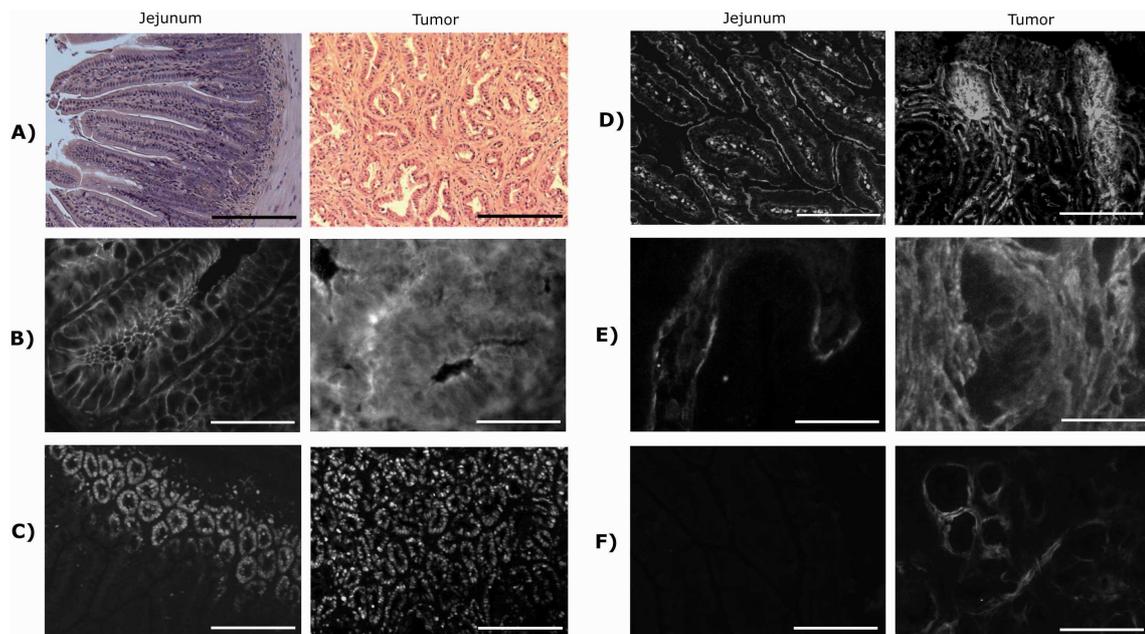
### Abb.3.7: DN-Bcat induziert die Tumorentstehung

(A) Inzidenz und Verteilung der Läsionen im Darm von Wildtyp-, Neo- und Bcat-Mäusen. In Bcat-Mäusen entstehen gendosisabhängig Tumore, die relativ klein und in einem frühen Tumorstadium sind. (B) Makroskopisches Beispiel für ein Adenom im Kolon einer Bcat-Maus. Methylenblau-Färbung, 50-fache Vergrößerung, Maßstab = 200  $\mu$ m. het = heterozygot, hom = homozygot.

#### 3.1.1.6 Verschiedene Wnt-Zielgene sind in Tumoren von Bcat-Mäusen dereguliert

Die Läsionen, die im Dünndarm von Bcat-Mäusen entstanden waren, wurden in immunhistologischen und Immunfluoreszenz-Analysen untersucht (Abb.3.8). In der Hämatoxylin/Eosin-Färbung ist an einem Beispiel zu erkennen, dass die Tumore gut differenziert waren und glanduläre Strukturen vorhanden waren. Die Zellkerne zeigten keine Atypien, und der Stromaanteil war sehr hoch. Diese Merkmale weisen histopathologisch auf ein hochgradiges Adenom hin (Abb.3.8A). Es konnten keine Anzeichen für infiltrierende Karzinome gefunden werden. Die Immunfluoreszenz von mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper gefärbten Schnitten zeigte, dass in den Tumoren  $\beta$ -Catenin weniger stark an der Membran lokalisiert war als im Normalgewebe. Allerdings konnte mittels Immunfluoreszenz kein eindeutig nukleäres  $\beta$ -Catenin detektiert werden (Abb.3.8B). Dass die Läsionen hyperproliferativ waren, konnte durch Ki67-Färbung nachgewiesen werden. Im Normalgewebe befanden sich die proliferierenden Zellen dagegen ausschließlich im sogenannten „Transit Amplifying Compartment“ oberhalb der Krypten (Abb.3.8C). Die Markierung von F-Aktin veranschaulicht die stark veränderte Gewebsorganisation im Tumor, während im Normalgewebe die „Brush Border“ (Bürstensaum) auf der apikalen Seite der Epithelzellen deutlich auszumachen

war (Abb.3.8D). Interessanterweise wurden in den Läsionen von Bcat-Mäusen Tenascin-C und -W stark überexprimiert (Abb.3.8E,F). Tenascine sind Glykoproteine der extrazellulären Matrix, die bei Gewebeumwandlungen, Entzündungen und Wundheilungsprozessen verstärkt exprimiert werden (Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Tenascin-C und -W sind Wnt-Zielgene, die in vielen Krebsarten überexprimiert werden und dort an der Modulation der Adhäsion und Proliferation beteiligt sind.

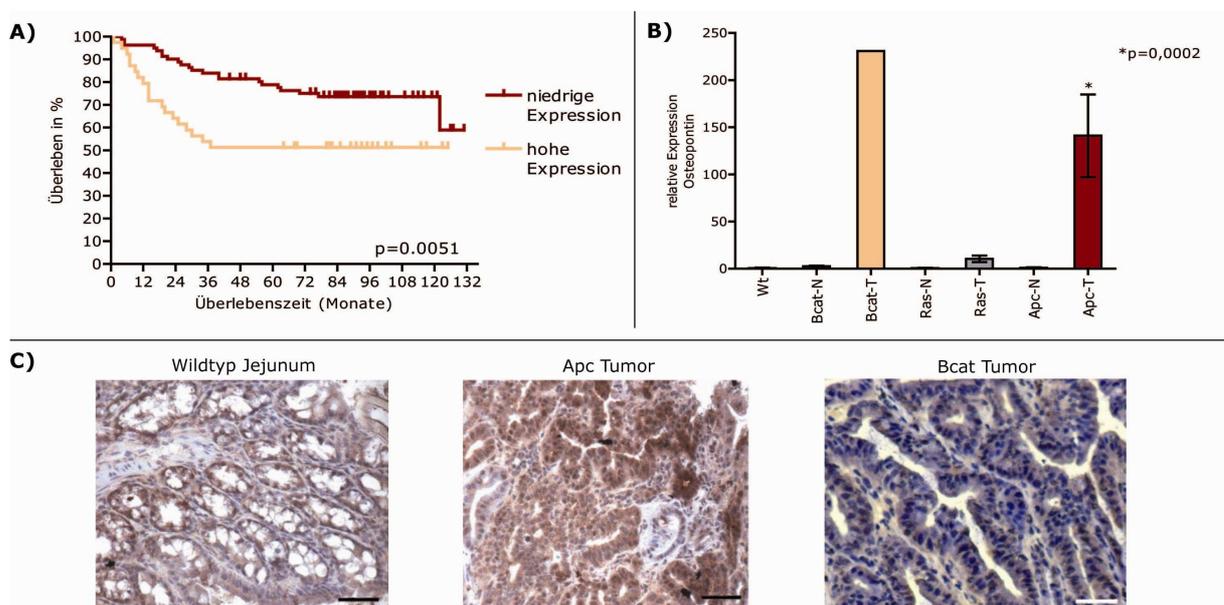


**Abb.3.8: Immunhistochemische Analyse von Tumoren aus Bcat-Mäusen**

Kryoschnitte von Normalgewebe (Jej) und einer Läsion aus einer Bcat-Maus. **(A)** HE Färbung (50-fache Vergrößerung, Maßstab = 200  $\mu$ m (Jejunum); 200-fache Vergrößerung, Maßstab = 50  $\mu$ m (Tumor)). Die Läsion kann histopathologisch als hochgradiges Adenom eingestuft werden. **(B)** Immunfluoreszenz mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper (400-fache Vergrößerung, Maßstab = 25  $\mu$ m). Membranständiges  $\beta$ -Catenin im Normalgewebe. Die Lokalisierung in der Läsion ist diffuser, es ist keine Membranfärbung mehr vorhanden, aber nukleäres  $\beta$ -Catenin kann nicht eindeutig detektiert werden. **(C)** Immunfluoreszenz mit anti-Ki67 Antikörper (100-fache Vergrößerung, Maßstab = 100  $\mu$ m). Starke Proliferation in der gesamten Läsion. Im Normalgewebe ist die Proliferation auf die Krypten beschränkt. **(D)** Immunfluoreszenz mit Phalloidin, das filamentöses Aktin anfärbt (100-fache Vergrößerung, Maßstab = 100  $\mu$ m). Starke Veränderung des Aktin-Zytoskelettes im Tumor von Bcat-Mäusen. **(E+F)** Immunfluoreszenz mit anti-Tenascin-C (400-fache Vergrößerung, Maßstab = 25  $\mu$ m) und anti-Tenascin-W Antikörper (200-fache Vergrößerung, Maßstab = 50  $\mu$ m). Erhöhte Expression von Tenascin-C und -W in der Läsion. Tenascin-C wird bereits im Normalgewebe exprimiert, während Tenascin-W hier nicht detektierbar ist.

### 3.1.1.7 Osteopontin als Wnt-Zielgen

Osteopontin ist ein sekretiertes Phosphoprotein, das mit Tumorprogression in vielen soliden Tumoren in Verbindung gebracht wird (Yeatman und Chambers, 2003). Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine hohe Osteopontin Expression Darmkrebs-Patienten mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose identifiziert, und einen unabhängigen Prognoseparameter für Kolontumore darstellt (Abb.3.9A). Außerdem wurde Osteopontin als Zielgen des Wnt-Signalweges identifiziert, das in vielen kolorektalen Tumoren dereguliert ist (Rohde et al., 2007). Liegt eine Mutation im *Apc* Gen vor, wird Osteopontin stark überexprimiert, wie an Tumoren von *Apc*<sup>1638N</sup>-Mäusen (Kap.1.3.3, Abb.1.7, Kap.3.1.2) gezeigt werden konnte (Rohde et al., 2007). Um zu untersuchen, ob die Wnt-Aktivierung durch onkogenes  $\beta$ -Catenin ebenfalls zu einer erhöhten Osteopontin Expression führt, wurden Läsionen aus einer *Bcat*-Maus mittels qRT-PCR und Immunhistologie untersucht (Abb.3.9B,C). Auf RNA-Ebene zeigte sich, wie in Tumoren von *Apc*<sup>1638N</sup>-Mäusen, eine stark erhöhte Osteopontin Expression (Abb.3.9B). Im Gegensatz dazu konnte auf immunhistologischen Schnitten in einer von zwei Läsionen der *Apc*<sup>1638N</sup>-Mäuse Osteopontin detektiert werden (Abb.3.9C). Insgesamt wurde in einer von drei Läsionen aus *Bcat*-Mäusen eine erhöhte Osteopontin Expression nachgewiesen.



**Abb.3.9: Osteopontin mRNA wird in *Bcat*-Tumoren überexprimiert. Osteopontin Expression als prognostischer Faktor in humanen Kolorektalkarzinomen.**

**(A)** Kaplan-Meier Analyse von 120 Fällen von humanen Kolontumoren. Basierend auf den Ergebnissen der qRT-PCR wurde ein Schwellenwert festgelegt, der einer  $\geq 9$ -fachen Überexpression von Osteopontin entspricht. Der Log-Rank Test zeigt, dass Patienten mit hoher Osteopontin Expression ( $n=39$ ) eine signifikant ( $p=0,0051$ ) geringere Überlebensrate haben als Patienten mit niedriger Osteopontin Expression ( $n=81$ ). Modifiziert nach Rohde et al., 2007. **(B)** Bestimmung der mRNA Expression von Osteopontin mRNA durch qRT-PCR in Jejunum (N) und Tumoren (T) von Wildtyp-, *Bcat*-, *Ras*- und *Apc*-Mäusen (jeweils  $n=5$ , *Bcat*-T:  $n=1$ ). Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression aller Wildtyp Jejunum-Proben normalisiert (1,0). Alle Proben wurden

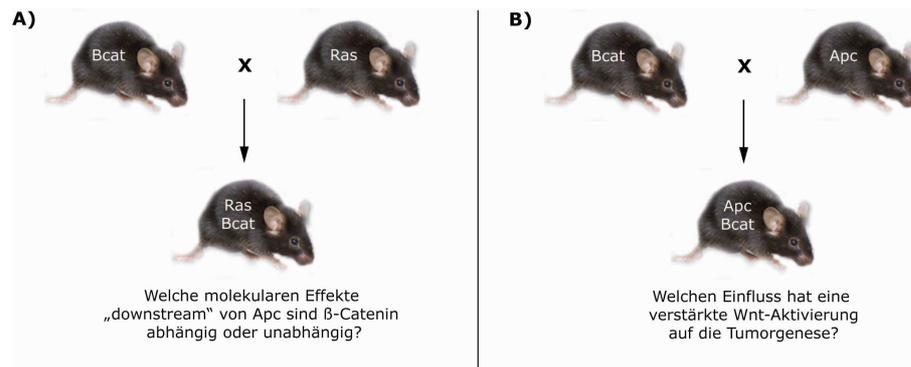
zweifach gemessen. Osteopontin ist in Tumoren von Apc-Mäusen signifikant ( $p = 0,0002$ ) gegenüber Ras-Tumoren erhöht. Auch in dem Tumor mit onkogenem  $\beta$ -Catenin liegt eine erhöhte Osteopontin Expression vor. **(C)** Immunhistochemische Detektion von Osteopontin von Normalgewebe (Jejunum) einer Wildtyp-Maus, Apc<sup>1638N</sup>- und Bcat-Tumoren. 200-fache Vergrößerung, Maßstab = 50  $\mu$ m. Tumore von Apc<sup>1638N</sup>-Mäusen (1 von 2) zeigen eine verstärkte Osteopontin Färbung, während in zwei weiteren Läsionen aus Bcat-Mäusen Osteopontin nicht überexprimiert wird.

### 3.1.1.8 Zusätzliche Mutationen

Um zu überprüfen, ob in Tumoren von Bcat-Mäusen neben dem mutierten  $\beta$ -Catenin noch weitere spontane Mutationen aufgetreten waren, wurde die genomische DNA auf einen Verlust der Heterozygotie (LOH: Loss of heterozygosity, PCR-basierte Analyse der Mikrosatelliten-DNA) im *p53* und *Apc* Genlokus untersucht. Es lag kein LOH in diesen beiden Genen vor, auch nicht in den untersuchten Tumoren von RasBcat-Mäusen ( $n=4$  Tumore) (Kap.3.1.2). Zusätzlich zeigte die Sequenzierung von Tumor-DNA ( $n=8$ ), dass in den Läsionen der Bcat- und RasBcat-Tiere keine Mutationen im *KRAS* bzw. *NRAS* Gen vorhanden waren.

### 3.1.2 Generierung neuer kombinierter Mausmodelle für kolorektale Karzinome

Das gleichzeitige Vorhandensein von onkogenem Kras und einer Mutation im Tumorsuppressorgen Apc im kombinierten RasApc-Modell (Kreuzung der Apc<sup>1638N/+</sup>- und pVillin-Kras<sup>V12G</sup>-Maus) zeigte, dass es zu einer synergistischen Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges durch Kras kommt (Abb.1.7). In Gegenwart von onkogenem Kras konnte *in vivo* eine erhöhte Anzahl von Zellen mit nukleärem  $\beta$ -Catenin in Tumoren, sowie eine Verstärkung der Wnt-Transkriptionsaktivität *in vitro* im TOP-FLASH Assay festgestellt werden (Janssen et al., 2006). Um den Einfluss von Ras, Apc und  $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung und Tumorprogression im Darm besser verstehen zu können, wurden zwei neue Mausmodelle für kolorektale Karzinome generiert (Abb.3.10). Zunächst wurde die pVillin-Kras<sup>V12G</sup>-Maus (Janssen et al., 2002, im Folgenden als „Ras-Maus“ bezeichnet) mit der Bcat-Maus gekreuzt, um zu untersuchen, ob die Effekte von Apc, die zur drastischen Erhöhung der Tumorentstehung in den RasApc-Mäusen (Janssen et al., 2006, Abb.1.7) führen, tatsächlich ausschließlich auf die verstärkte Präsenz von  $\beta$ -Catenin im Zellkern zurückzuführen sind, oder ob Wnt-unabhängige Effekte eine Rolle spielen. Diese Tiere wurden als „RasBcat-Mäuse“ bezeichnet (Abb.3.10A). Um weiterhin die Auswirkungen einer verstärkten Aktivierung des Wnt-Signalweges auf die Tumorentstehung zu analysieren, wurde die Apc<sup>1638N/+</sup>-Maus (Fodde et al., 1994, im Folgenden als „Apc-Maus“ bezeichnet) mit der Bcat-Maus gekreuzt („ApcBcat“) (Abb.3.10B). Dieses Modell entspricht einer Untergruppe humaner Kolorektalkarzinome, die zwei unabhängige Mutationen in Genen des Wnt-Signalweges aufweisen (Suraweera et al, 2006). Beide kombinierten Mausmodelle sind lebensfähig, und Nachkommen entstehen in der normalen Mendelschen Frequenz.



### Abb.3.10: Generierung der RasBcat- und der ApcBcat-Maus (Schema)

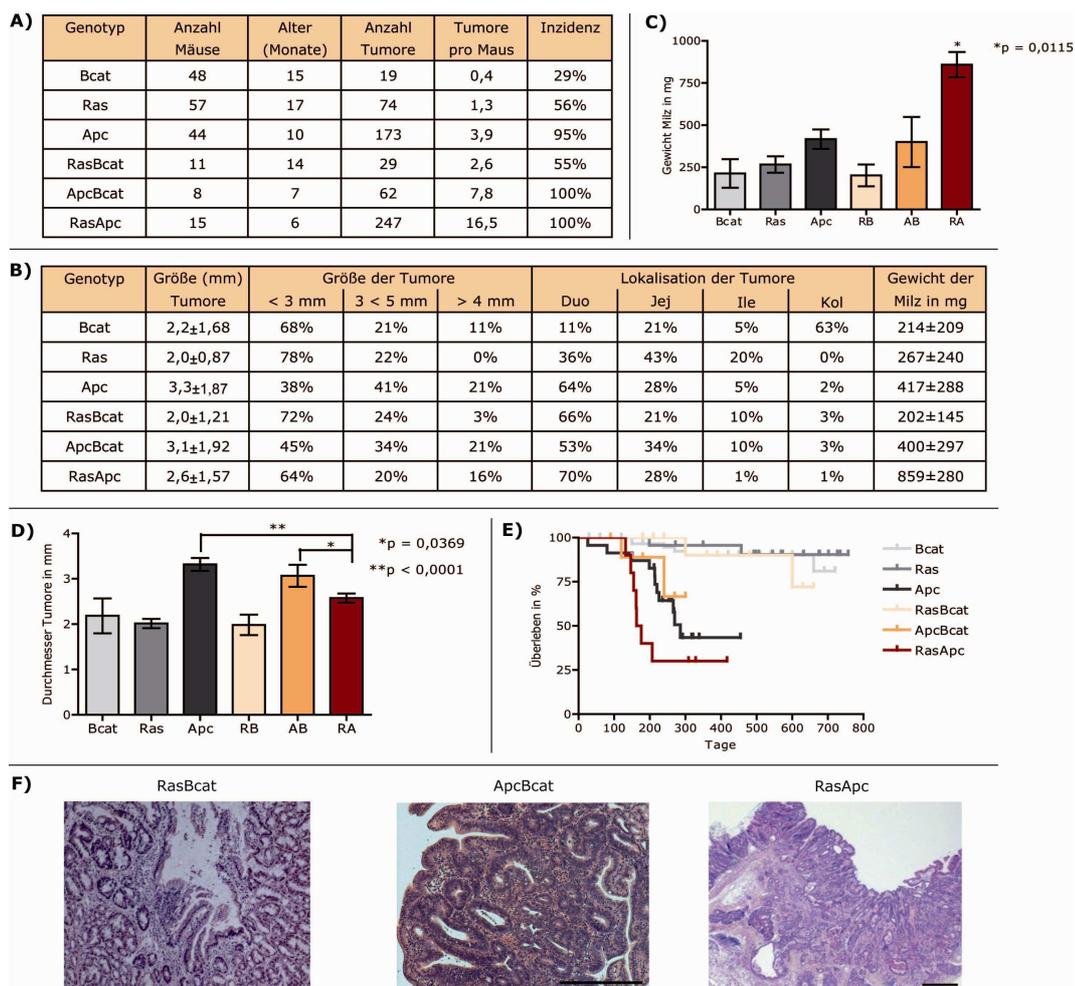
**(A)** Die Kreuzung der pVillin-Kras<sup>V12G</sup>-Maus mit der A33<sup>DN-Bcat</sup>-Maus führt zur Entstehung der RasBcat-Mäuse.

**(B)** Ein weiteres neues Mausmodell ist die ApcBcat-Maus, die durch die Verpaarung von Apc<sup>1638N/+</sup>- und A33<sup>DN-Bcat</sup>-Mäusen generiert wurde.

#### 3.1.2.1 Unterschiedlich starke Tumorinitiation und Tumorprogression in den verschiedenen Mausmodellen

Um den Einfluss von Ras, Apc und  $\beta$ -Catenin auf die Tumorgenese, und insbesondere die Interaktionen zwischen den verschiedenen Signalwegen zu untersuchen, wurden die einzel-transgenen (Bcat-, Ras-, Apc-) und doppel-transgenen (RasBcat-, ApcBcat-, RasApc-) Tiermodelle auf Anzahl, Häufigkeit und Verteilung der Tumore sowie Morbidität und Sterblichkeit analysiert (Abb.3.11, Tiere mit heterozygotem und homozygotem A33<sup>DN-Bcat</sup>-Allel wurden hier zusammengefasst, da kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand). Wie bereits im Kapitel 3.1.1.5 beschrieben, entwickelten die Bcat-Mäuse (n=48) nur wenige Tumore (Inzidenz 29%), die meist klein waren (Durchmesser 2,2 mm) und hauptsächlich im Kolon lokalisiert waren (63%). Eine Mutation im KRAS Gen führte im Vergleich zu einer ausgeprägteren Tumorgenese (Ras-Maus, n=57, Inzidenz 56%), die noch stärker war, wenn eine Mutation im Apc Gen vorlag (Apc-Maus, n=44, Inzidenz 95%). Auch das Tumorwachstum war in den Apc-Tieren erhöht, was an der Tumorgröße (3,3 mm, 62% der Läsionen sind größer als 3 mm) erkennbar war (Abb.3.11D). Die Apc-Mäuse hatten im Vergleich zu den Ras- und Bcat-Tieren eine vergrößerte Milz (417 mg, Abb.3.11C) und starben meist schon im Alter von 10 Monaten (Abb.3.11E). Die gleichzeitige Expression von aktiviertem Ras und onkogenem  $\beta$ -Catenin (RasBcat-Maus, n=11) führte zu einer 2-fach erhöhten Tumorzahl pro Maus (2,6 pro Tier) im Vergleich zu den Ras-Mäusen. Die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin in Ras-Mäusen rekapituliert nur teilweise die Effekte von mutiertem Apc im Ras Hintergrund, was auf die unterschiedlich starke Wnt-Aktivierung in Apc- und Bcat-Mäusen oder auf Wnt-unabhängige Effekte in Apc-Mäusen zurückgeführt werden kann. Eine verstärkte Wnt-Aktivierung wurde im ApcBcat-Mausmodell realisiert. Diese Mäuse (n=8) entwickelten dreimal so viele Tumore wie die RasBcat-Tiere und doppelt so viele Tumore wie die Apc-Mäuse, mit vergleichsweise geringer Latenz. Jedoch kann die verstärkte Wnt-Aktivierung nicht den Effekt eines aktivierten Ras-Signalweges auf die Tumorentstehung rekapitulieren, da nur halb

so viele Tumore wie in den RasApc-Mäusen entstanden (7,8 pro Tier). In den RasApc-Mäusen lag das Verhältnis von Adenomen zu Karzinomen bei 1:1, das bedeutet, dass das selbst bei jungen Tieren die Hälfte aller makroskopisch erkennbaren Läsionen bis zum Karzinom-Stadium fortgeschritten waren (Janssen et al., 2006). Dagegen waren in ApcBcat-Mäusen Karzinome selten und konnten in RasBcat-Tieren nicht nachgewiesen werden (Abb.3.11F). Die Inzidenz lag bei beiden Mausmodellen bei 100%. Die Morbidität der ApcBcat-Mäuse war ebenfalls nicht so ausgeprägt wie in den RasApc-Mäusen. Die Milz war zwar vergrößert, jedoch ohne Unterschiede zu Apc-Mäusen, und im Durchschnitt nur halb so groß wie die der RasApc-Tiere. Eine verstärkte Wnt-Aktivierung scheint das Tumorwachstum zu fördern, da Tumore von ApcBcat-Mäusen größer als RasApc Läsionen (3,2 mm zu 2,6 mm Durchmesser) waren. Die Sterblichkeit wird durch die Anzahl, nicht aber durch die Größe der Tumore beeinflusst. RasApc-Mäuse starben im Durchschnitt bereits nach 6 Monaten, während Apc- und ApcBcat-Tiere meist bis zu 10 Monate überlebten (Abb.3.11E). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges ist also für die Initiation der Tumorentstehung ausreichend, wird aber durch die zusätzliche Aktivierung des Ras-Signalweges synergistisch verstärkt. Hingegen wird das Tumorwachstum durch die Stärke der Wnt-Aktivierung beeinflusst.



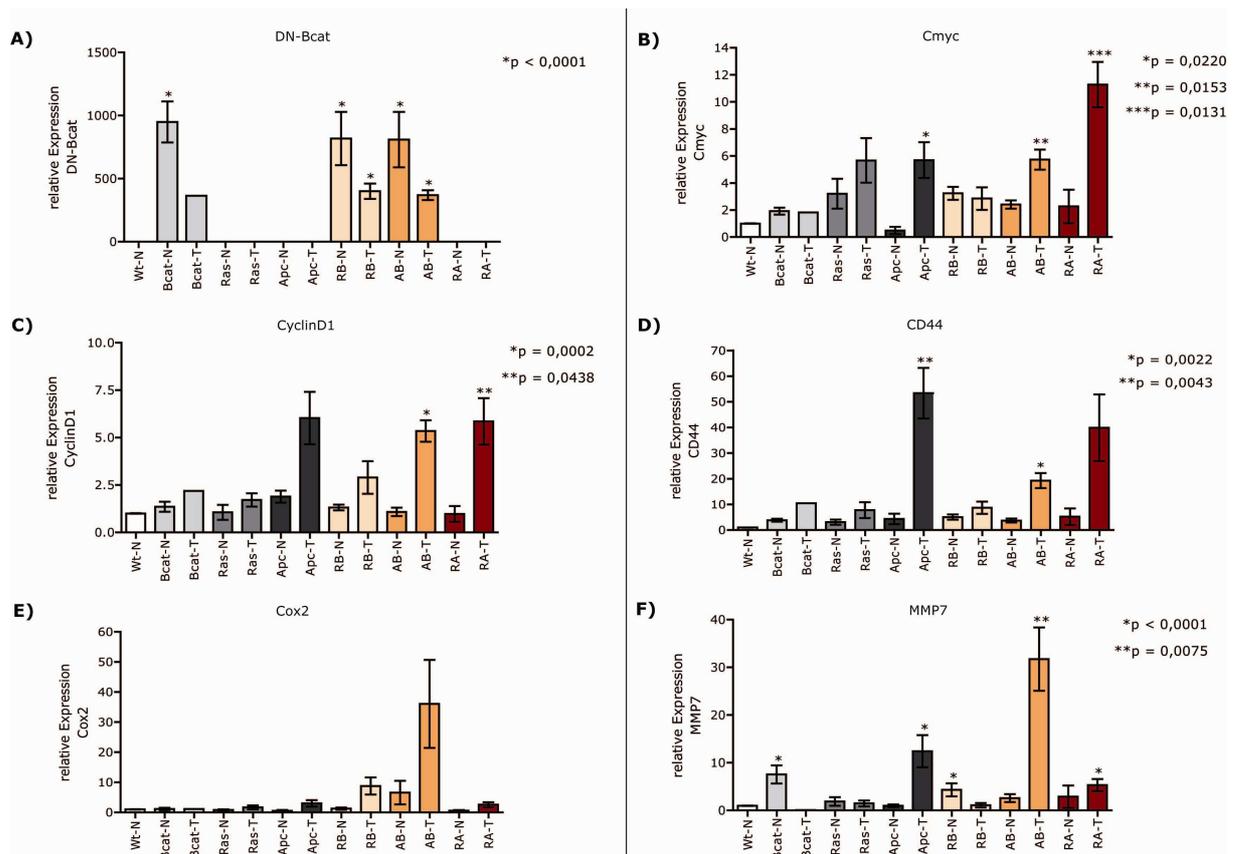
**Abb.3.11: Unterschiedlich starke Tumorgenese in den verschiedenen Mausmodellen**

**(A)** Häufigkeit und Anzahl der Tumore im Darm von einzel-transgenen und doppel-transgenen Mausmodellen (Tiere mit heterozygotem und homozygotem A33<sup>DN-Bcat</sup>-Allel wurden zusammengefasst, da kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand). **(B-E)** Überblick über die Größe der Tumore, Morbidität und Überlebensrate der unterschiedlichen Mausmodelle. RB = RasBcat, AB = ApcBcat, RA = RasApc. **(C)** Das Gewicht der Milz gibt Auskunft über die Morbidität. Die Splenomegalie zeigt, dass die drastische Tumorentstehung den Gesundheitszustand der RasApc-Mäuse stark beeinträchtigt. Interessanterweise weisen die ApcBcat-Tiere im Vergleich zu den Apc-Mäusen keine Unterschiede in der Milzgröße auf. **(D)** Die Größe der Tumore ist in den Apc- und ApcBcat-Mäusen im Vergleich zu den anderen Mausmodellen signifikant erhöht ( $p < 0,0001$  (Apc),  $p = 0,0369$  (ApcBcat)). **(E)** Kaplan-Meier Analyse der Überlebensraten von verschiedenen Mausmodellen. Ras-, Bcat- und RasBcat-Mäuse zeigen eine normale Sterblichkeit, sie werden wie Wildtyp-Tiere (nicht gezeigt) bis zu 2 Jahre alt. Apc- und ApcBcat-Tiere werden oft nach 8-10 Monaten krank und sterben meist innerhalb von einem Jahr auf Grund der Tumorentstehung im Darm (signifikant erhöhte Sterblichkeit gegenüber Ras- ( $p=0,0212$ ) und Bcat- ( $p=0,0332$ ) Tieren). Die drastische Tumorentstehung in den RasApc-Mäusen führt dazu, dass über 70% der Tiere schon nach einem halben Jahr sterben (signifikante Erhöhung der Sterblichkeit gegenüber Ras-, Bcat- ( $p<0,0001$ ) und RasBcat- ( $p=0,001$ ) Mäusen). **(F)** HE-Färbung von ausgewählten Läsionen der kombinierten Mausmodelle (50-fache Vergrößerung, Maßstab = 200  $\mu\text{m}$  (RasApc); 100-fache Vergrößerung, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$  (RasBcat, ApcBcat)). Alle Läsionen sind im Dünndarm lokalisiert, aber die Tumorstadien sind stark unterschiedlich. RasBcat: Adenom, ApcBcat: Karzinom *in situ*, RasApc: invasives Karzinom.

### 3.1.2.2 Wnt-Zielgene werden in den Mausmodellen unterschiedlich stark exprimiert

Die unterschiedliche Tumorgenese in den verschiedenen Mausmodellen lässt vermuten, dass auch die Transkription der Wnt-Zielgene unterschiedlich reguliert ist. Um dies zu untersuchen, wurden qRT-PCR Analysen von Jejunum und Tumorgewebe aus Wildtyp- (nur Jejunum), Bcat-, Ras-, Apc-, RasBcat-, ApcBcat- und RasApc-Mäusen durchgeführt (Abb.3.12). Wie zu erwarten, wird DN-Bcat spezifisch nur in Bcat- bzw. doppel-transgenen RasBcat- und ApcBcat-Mäusen exprimiert, wobei in den getesteten Läsionen nur etwa halb soviel DN-Bcat exprimiert wurde wie im Durchschnitt der Normalgewebe (Abb.3.12A). CyclinD1 war signifikant in Apc-mutierten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe erhöht (Abb.3.12C), wobei die Expression von onkogenem Kras oder DN-Bcat allein oder in Kombination mit mutiertem Apc, keinen Einfluss auf die CyclinD1 Expression hatte. Daraus lässt sich schließen, dass eine Apc Mutation vor allem durch die Aktivierung des klassischen Wnt-Zielgens CyclinD1 zur Tumorentstehung beiträgt. Dagegen war in den RasApc-Läsionen die Cmyc Expression im Vergleich zu den Ras-, Apc- und ApcBcat-Läsionen wesentlich stärker (Abb.3.12B), d.h. die Aktivierung der Ras-Signalkaskade fördert synergistisch die Transkription von Cmyc. CD44 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie CyclinD1, und wurde besonders in Tumoren von Apc- und RasApc-Mäusen überexprimiert (Abb.3.12D). Interessanterweise fand man nur in den ApcBcat-Tumoren eine erhöhte Cox2 Expression (Abb.3.12E). Möglicherweise ist für die Transkription von Cox2 eine sehr starke Wnt-Aktivierung nötig. Die Expression von MMP7 war nur in Apc- und ApcBcat-Tumoren erhöht. Da die Tumore in beiden Mausmodellen auch größer waren als in RasApc-Mäusen (Abb.3.11C), scheint die MMP7 Expression mit dem Tumorwachstum bzw. der Tumorprogression zu korrelieren. Wie bereits beschrieben (Kap.3.1.1.3) wurde im Normalgewebe

von Bcat-Mäusen MMP7, wohl aufgrund der erhöhten Anzahl von Panethzellen, verstärkt exprimiert (Abb.3.12F). Alle Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der Wnt-Zielgene sehr komplex ist. CyclinD1 und CD44 werden allein durch eine Wnt-Aktivierung reguliert, während Cmyc durch einen synergistischen Effekt durch mutiertes Ras zusätzlich aktiviert wird. Die Expression von Cox2 und in geringerem Ausmass von MMP7 stellt ein Sonderfall dar, der nur bei gleichzeitiger Mutation zweier Gene des Wnt-Signalweges auftritt.



**Abb.3.12: Wnt-Zielgene werden in den Mausmodellen unterschiedlich stark exprimiert**

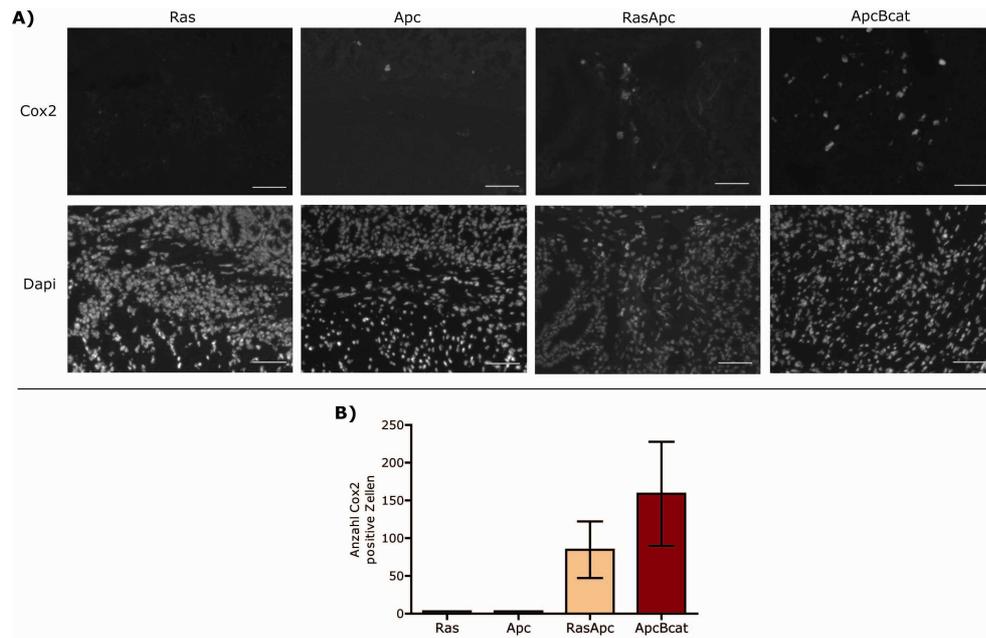
**(A-F)** Bestimmung der mRNA Expression durch qRT-PCR in Jejunum (N) von Wildtyp-Mäusen sowie Jejunum (N) und Tumoren (T) von Bcat-, Ras-, Apc-, RasBcat- (RB), ApcBcat- (AB) und RasApc- (RA) Mäusen (n=5). Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression aller Wildtyp Jejunum-Proben normalisiert (1,0). Alle Proben wurden zweifach gemessen. **(A)** Relative Expression des transgenen DN-Bcat. DN-Bcat wird spezifisch nur in Bcat-Mäusen exprimiert (Bcat, RB, AB). In den Läsionen ist die Expression etwa halb so stark wie im Normalgewebe. **(B)** Relative Expression von Cmyc. Alle Mausmodelle zeigen eine signifikant erhöhte Cmyc Expression im Normalgewebe im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression von Cmyc ist signifikant erhöht in den Apc- (p = 0,022), ApcBcat- (p = 0,0153) und RasApc- (p = 0,0131) Tumoren im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe. In den RasApc-Läsionen ist die Cmyc Expression im Vergleich zu den ApcBcat- (p = 0,0068) und Ras- (p = 0,0387) Läsionen signifikant erhöht. **(C)** Relative Expression der CyclinD1 mRNA. In den Tumoren von Apc-, ApcBcat- (p = 0,0002) und RasApc- (p = 0,0438) Mäusen ist die CyclinD1 Expression gleich stark erhöht. **(D)** Die relative Expression von CD44 ist sowohl in den Apc- (p = 0,0043) als auch in den ApcBcat- (p = 0,0022) Tumoren im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe erhöht. **(E)** Eine Erhöhung der Expression der Cox2 mRNA (30-fach) ist nur in den ApcBcat-Tumoren detektierbar. **(F)** Die MMP7 RNA wird

signifikant verstärkt exprimiert ( $p < 0,0001$ ) in den Tumoren von Apc- und RasApc-Mäusen sowie im Normalgewebe von Bcat- und RasBcat-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. In den Tumoren von ApcBcat-Tieren ist MMP7 signifikant ( $p = 0,0075$ ) überexprimiert im Vergleich zum Normalgewebe.

### **3.1.2.3 Verstärkte Cox2 Expression in ApcBcat- und RasApc-Tumoren**

Das Enzym Cox2 (Cyclooxygenase 2) produziert Eikosanoide aus Arachidonsäure und reguliert so die Aufnahme von Salz, Wasser, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Das durch Cox2 entstehende Prostaglandin-E2 fördert das Tumorwachstum und die Metastasierung durch Stimulation der Zellproliferation, Invasion und Angiogenese (Mann et al., 2005).

Um die erhöhte Expression der Cox2 mRNA in ApcBcat-Tumoren (Abb.3.12E) auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Normalgewebe und Tumore von Ras-, Apc-, RasApc- und ApcBcat-Mäusen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti-Cox2 Antikörper gefärbt (Abb.3.13). Im Normalgewebe (nicht gezeigt) und in den Ras- und Apc-Läsionen waren kaum Cox2 positive Zellen zu finden, während in den RasApc- und ApcBcat-Läsionen die Anzahl der Cox2 positiven Zellen erhöht war. Diese Zellen befanden sich nicht im Darmepithel (vgl. Dapi-Färbung), sondern im Stroma des Tumors. Bei diesen Zellen könnte es sich um Makrophagen handeln (Taketo 1998; Hull et al., 1999; Shattuck-Brandt et al., 2000). Cox2 wird anscheinend erhöht exprimiert, wenn die Wnt-Aktivierung besonders stark ist (ApcBcat-Tumore). Auch in RasApc-Tumoren waren mehr Cox2 exprimierende Zellen angefärbt, was aber auf mRNA Ebene nicht nachweisbar war (Abb.3.12E). Dass die Cox2 Expression auch über den Ras-Signalweg reguliert wird, zeigten arbeiten von Sheng und Backlund (Sheng et al., 2001; Backlund et al., 2005). Es ist möglich, dass die erhöhte Cox2 mRNA Expression in ApcBcat-Tumoren nicht durch eine direkte Wnt-Aktivierung, sondern indirekt durch die Cox2 positiven Stromazellen hervorgerufen wird, da bei der Aufreinigung der mRNA der gesamte Tumor, und nicht nur die epithelialen Tumorzellen verwendet wurden. ApcBcat-Tumore weisen im Vergleich zu den Tumoren von Ras-, Apc- und RasApc-Tumoren einen hohen Stroma-Anteil auf.

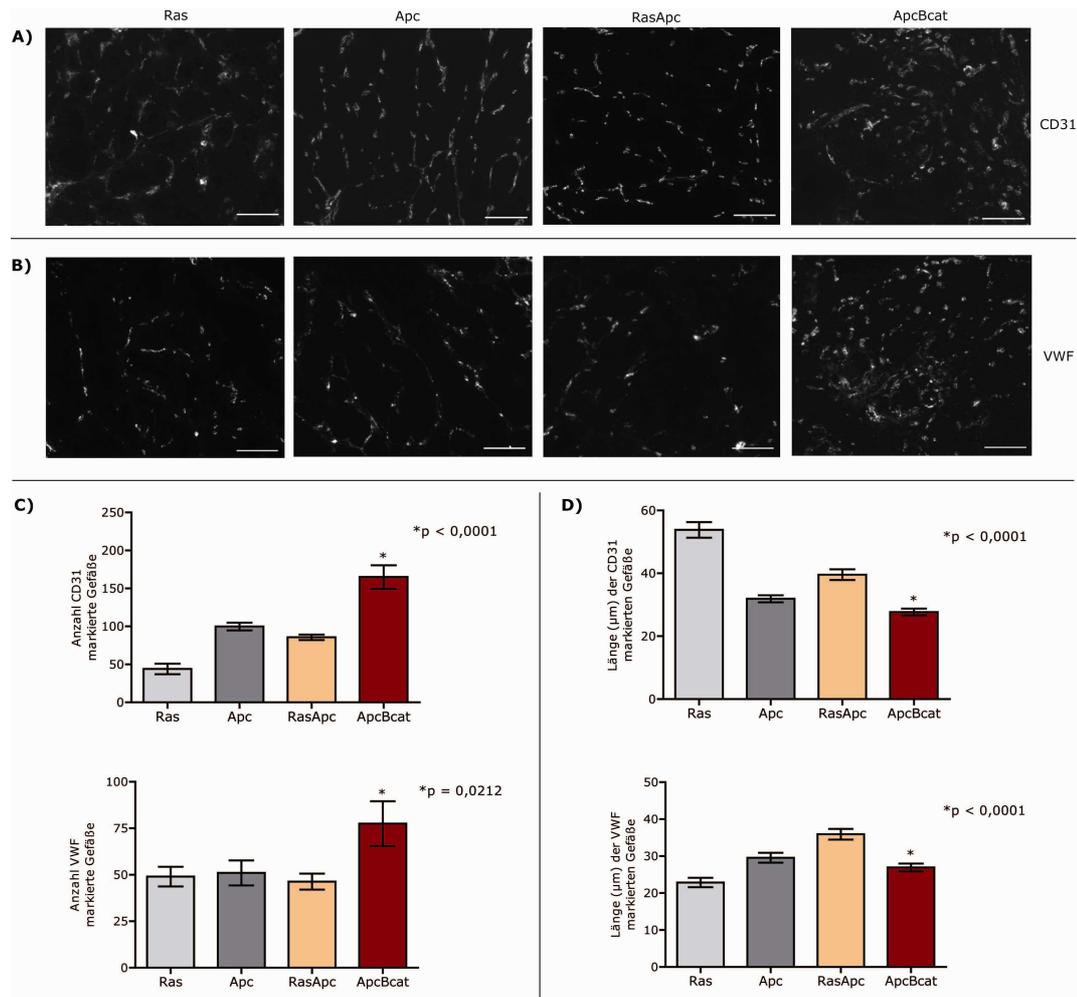


**Abb.3.13: Erhöhte Anzahl an Cox2 exprimierenden Zellen in ApcBcat- und RasApc-Läsionen**

Kryoschnitte von Tumoren aus Ras-, Apc- RasApc- und ApcBcat-Mäusen. **(A)** Immunfluoreszenz mit anti-Cox2-Antikörper und Dapi-Färbung. 200-fache Vergrößerung, Maßstab = 50  $\mu$ m. **(B)** Auszählung der Cox2 positiven Zellen pro Gesichtsfeld (n=4/Tumor, je 2 Mäuse untersucht). In den ApcBcat- und RasApc-Tumoren ist die Zahl der Zellen, die Cox2 exprimieren, erhöht.

### 3.1.2.4 Verstärkte Blutgefäßbildung in den Tumoren aus ApcBcat-Mäusen

In ApcBcat-Mäusen waren die Tumore signifikant größer als in RasApc-Mäusen. Um eine mögliche Erklärung für dieses beschleunigte Tumorwachstum zu finden, wurden Tumore aus ApcBcat-, sowie aus Apc-Tieren, und zur Kontrolle auch Tumore der anderen Mausmodelle mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die Versorgung mit Blutgefäßen untersucht. Dafür wurden CD31 und VWF (von Willebrand Faktor) als Marker für Endothelzellen der Blutgefäße verwendet (Abb.3.14). Sowohl die Immunfluoreszenz-Analyse mit anti-CD31, als auch mit anti-VWF spezifischen Antikörpern zeigten, dass die Tumore der ApcBcat-Mäuse stärker durchblutet waren als die von Apc-, aber auch von Ras- und RasApc-Tieren (Abb.3.14A,B). Eine Quantifizierung verdeutlichte, dass die Anzahl der Gefäße signifikant erhöht war (Abb.3.14C), während die Länge der Gefäße geringer war (Abb.3.14D). Daraus kann man schließen, dass in den Tumoren der ApcBcat-Mäuse die Bildung neuer Blutgefäße verstärkt ist, was zu einer besseren Versorgung und somit zu einem schnelleren Wachstum des Tumors führt. Die erhöhte Expression von Cox2 und Osteopontin in den ApcBcat-Tumoren (Abb.3.12E, Abb.3.13) steht im Einklang mit diesen Ergebnissen, da Cox2 über die Produktion von Prostaglandin-E2 auch die Angiogenese stimuliert (Hoper et al., 1997; Cheng et al., 1998; Fukumura et al., 1998; Tsujii et al., 1998; Jones et al., 1999).



### Abb.3.14: Verstärkte Blutgefäßbildung in Tumoren von ApcBcat-Mäusen

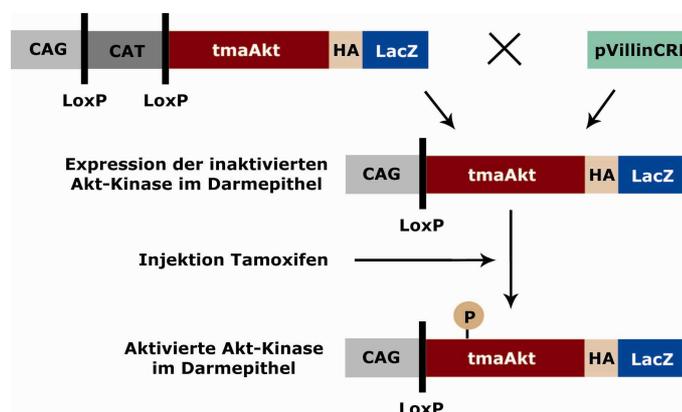
**(A-B)** Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Kryoschnitten von Tumoren aus Ras-, Apc-, RasApc- und ApcBcat-Mäusen (n=2). 100-fache Vergrößerung, Maßstab = 100 μm. Die anti-CD31 Färbung **(A)** und anti-VWF Färbung **(B)** zeigen, dass in den ApcBcat-Tumoren mehr Blutgefäße vorhanden sind. **(C)** Auszählung der Anzahl von CD31 bzw. VWF markierten Gefäße pro Gesichtsfeld. Die Anzahl der Blutgefäße ist in den ApcBcat-Tumoren signifikant erhöht (p<0,0001 CD31; p=0,0212 VWF, RasApc vs. ApcBcat). **(D)** Länge der CD31 (n=380 ausgemessene Gefäße) bzw. VWF (n=280 ausgemessene Gefäße) markierten Blutgefäße. Die Blutgefäße in den ApcBcat-Läsionen sind im Durchschnitt signifikant (p<0,0001, RasApc: 38 μm, vs. ApcBcat: 27 μm) kürzer, daher sind vermutlich mehr neu gebildete Gefäße vorhanden.

### 3.2 Projekt II: Einfluss von aktivierter Akt auf die Tumorentstehung

#### 3.2.1 Die tmaAkt/Z-Maus

Die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB (Proteinkinase B) reguliert als wichtigste Kinase im PI3K-Signalweg zelluläre Prozesse, wie Transkription, Translation, Zellproliferation, Zellwachstum und Zellüberleben (Datta et al., 1999; Vivanco und Sawyers, 2002).

Die tmaAkt/Z-Maus (im Folgenden als „Akt-Maus“ bezeichnet) ist eine transgene Maus, die eine durch Tamoxifen aktivierbare transgene Akt-Kinase exprimiert. Sie wurde von Thomas Sato (Universität Texas) generiert und zur Verfügung gestellt (Kroll et al., 2003). Das tmaAkt/Z Konstrukt enthält einen CAG Promotor ( $\beta$ -actin Chicken Promotor, mit CMV Enhancer), eine CAT Sequenz (CAT: Chloramphenicolacetyltransferase), flankiert von zwei LoxP-Stellen, die kodierende Sequenz der Akt-Kinase als Fusionsprotein mit dem mutierten murinen Östrogenrezeptor, gefolgt von einem HA-Tag (Hämagglutinin Epitop Tag) und der IRESLacZ Sequenz (IRES: Internal Ribosomal Entry Site) (Kroll et al., 2003). Der CAG Promotor erlaubt eine relativ ubiquitäre Expression des Transgens, wenn die CAT-Sequenz herausgeschnitten ist. Daher kommt es erst dann zur Expression der Akt, wenn die Akt-Maus mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Maus gekreuzt wird. Es wurde hier die pVillinCre-Maus (El Marjou et al., 2004) verwendet, um eine spezifische Expression der Akt im Darmepithel zu erhalten (CreAkt-Mäuse). Das *Villin* Gen kodiert ein Aktin-bindendes Protein, das spezifisch in den intestinalen Epithelzellen exprimiert wird, wo es an der strukturellen Organisation der aktinreichen Mikrovilli beteiligt ist. Die zusätzliche Expression von LacZ ermöglicht eine einfache Identifizierung der Zellen, die die Akt exprimieren. Die im Darm exprimierte Akt-Kinase ist zunächst inaktiv und muss durch die Gabe von Tamoxifen aktiviert werden, was erst die Phosphorylierung der transgenen Akt ermöglicht (Kroll et al., 2003) (Abb.3.15).

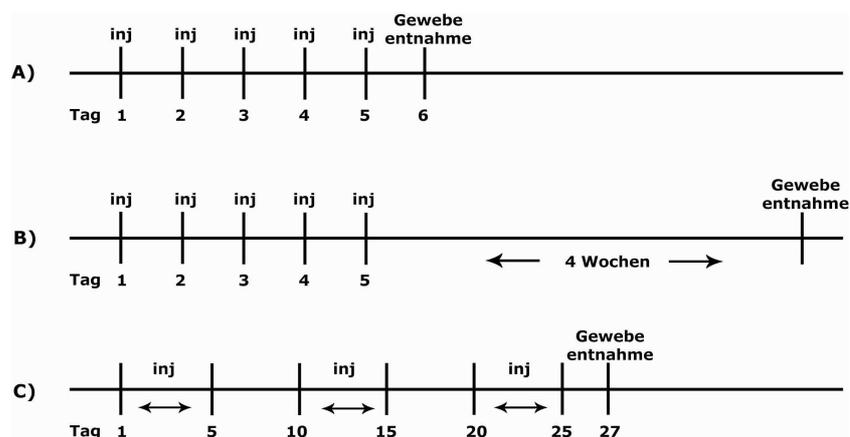


**Abb.3.15: Spezifische Expression und induzierbare Aktivierung der Akt-Kinase**

Die Kreuzung der Akt-Maus mit der pVillinCre-Maus führt zur Expression der inaktiven Akt-Kinase im Darmepithel. Erst die Gabe von Tamoxifen ermöglicht die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der transgenen Akt-Kinase. CAG:  $\beta$ -actin Chicken Promotor, mit CMV Enhancer, CAT: Chloramphenicol-

acetyltransferase, HA: Hämagglutinin Tag, Cre: Cre-Rekombinase, pVillin: 9kb regulatorische Region des murinen Villin Promotors. Modifiziert nach Kroll et al., 2003.

Die Behandlung der CreAkt-Mäuse mit Tamoxifen erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 1 mg Tamoxifen, gelöst in 100 µl Maisöl. Um die Wirkungsdauer bzw. Dosiseffekte von Tamoxifen auszutesten, wurden die Mäuse nach verschiedenen zeitlichen Protokollen behandelt (Abb.3.16). Den Kontrollmäusen wurde statt Tamoxifen die entsprechende Menge an Maisöl injiziert.

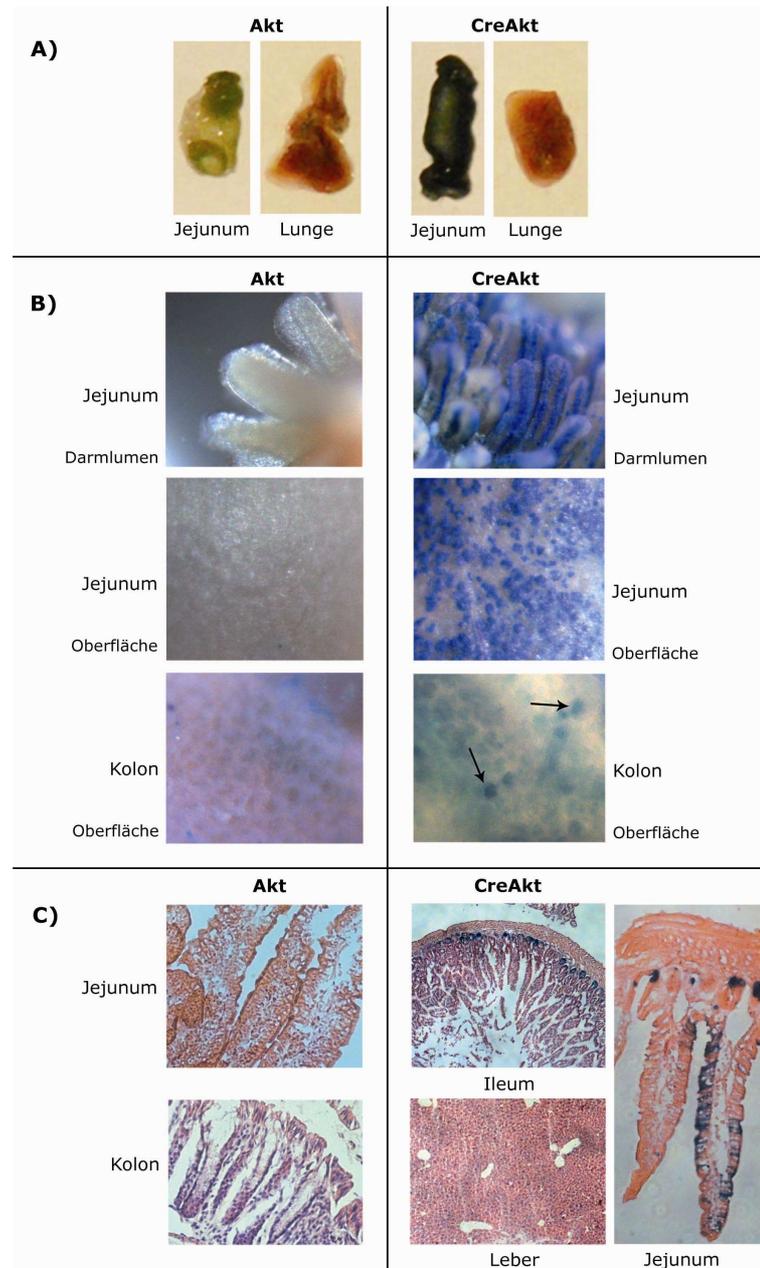


**Abb.3.16: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Behandlungen mit Tamoxifen**

Inj: intraperitoneale Injektion von 1 mg Tamoxifen, gelöst in 100 µl Maisöl.

### 3.2.1.1 Erfolgreiche Rekombination des transgenen Akt-Lokus durch die pVillinCre-Rekombinase

Nach der Generierung der CreAkt-Mäuse sollte zunächst eine erfolgreiche Rekombination des transgenen Akt-Lokus durch die Cre-Rekombinase im Darmepithel nachgewiesen werden. Dafür wurden verschiedene Gewebestücke von CreAkt- und Kontroll-Mäusen fixiert und mit X-Gal gefärbt, um die bei erfolgreicher Rekombination exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase zu detektieren (Abb.3.17). Kontroll-Mäuse (Cre, Akt) und Kontrollgewebe (Leber, Lunge) zeigten keine blau gefärbten Zellen, während in CreAkt-Mäusen die  $\beta$ -Galaktosidase durch kräftige Blaufärbung im Darmepithel nachgewiesen werden konnte (Abb.3.17A,B). Es wurde ein deutlicher Expressionsgradient detektiert, der von einer hohen Expression im Jejunum bis zu einer niedrigen Expression im Kolon reichte (Abb.3.17B). Dieser Effekt ist vermutlich auf die pVillin Promotoraktivität zurückzuführen. In HE (Hämatoxylin, Eosin) gefärbten Kryoschnitten der mit X-Gal gefärbten Mausgewebe sieht man, dass die  $\beta$ -Galaktosidase hauptsächlich in der basalen Schicht und nur vereinzelt in den Villi exprimiert wird (Abb.3.17C).

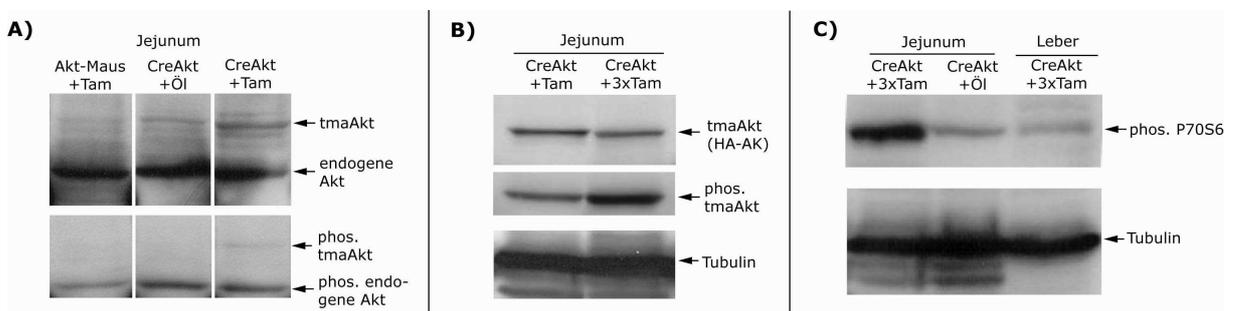


**Abb.3.17: Nachweis der gewebsspezifischen tmaAkt-Expression nach erfolgreicher Rekombination in CreAkt-Mäusen**

X-Gal Färbung von fixiertem Gewebe aus Kontroll- und CreAkt-Mäusen. Akt = tmaAkt/Z einzel-transgene Maus, CreAkt = pVillinCre x tmaAkt/Z doppel-transgene Maus. **(A)** Makroskopische Fotografie von mit X-Gal gefärbtem Jejunum- und Lungengewebe. Nur im Darm von CreAkt-Mäusen wird die  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert. **(B)** Mikroskopie der X-Gal gefärbten Gewebeproben (50-fache Vergrößerung). Keine Blaufärbung in Akt-Mäusen auf der äußeren Darmoberfläche und in den Villi sichtbar. In CreAkt-Mäusen liegt ein Expressionsgradient mit einer starken Expression im Jejunum und einer schwachen Expression im Kolon vor. **(C)** Mit HE gegengefärbte Kryoschnitte von X-Gal gefärbtem Gewebe (100 bis 200-fache Vergrößerung). Die Expression des Transgens erfolgt hauptsächlich in den Krypten und nur vereinzelt in den Villi.

### 3.2.1.2 Das transgene tmaAkt wird im Darm exprimiert und ist durch Tamoxifen aktivierbar

Nach der Behandlung der CreAkt-Mäuse mit Tamoxifen wurde die Aktivierung des Transgens geprüft. Proteinlysate von Jejunum und Leber aus unbehandelten und mit Tamoxifen injizierten Mäusen wurden im Western-Blot analysiert (Abb.3.18). Die endogene Akt hat ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa und wurde in allen Geweben exprimiert. Da die transgene Akt ein Fusionsprotein mit einer Domäne des Östrogenrezeptors darstellt, hat sie ein entsprechend höheres Molekulargewicht von ca. 90 kDa, und war nur im Darm von CreAkt-Mäusen detektierbar. Eine Phosphorylierung am Ser473 und damit eine Aktivierung erfolgten nur in den mit Tamoxifen behandelten CreAkt-Tieren (Abb.3.18A). Das verlängerte Injektionsprotokoll mit Tamoxifen (dreimal 5 Tage, Abb.3.16C) führte zu einer stärkeren Akt Aktivierung als bei Mäusen, die nur einmalig fünf Tage (Abb.3.16A) mit Tamoxifen behandelt wurden (Abb.3.18B). Die Kinase P70S6 wird über mTor durch aktivierte Akt phosphoryliert. Die verstärkte Phosphorylierung der P70S6-Kinase im Darmgewebe von mit Tamoxifen behandelten CreAkt-Mäusen zeigte, dass die aktivierte transgene Akt funktionell ist. In der Leber von Tamoxifen behandelten CreAkt-Mäusen und im Jejunum von unbehandelten CreAkt-Mäusen sah man keine Aktivierung der P70S6-Kinase (Abb.3.18C).

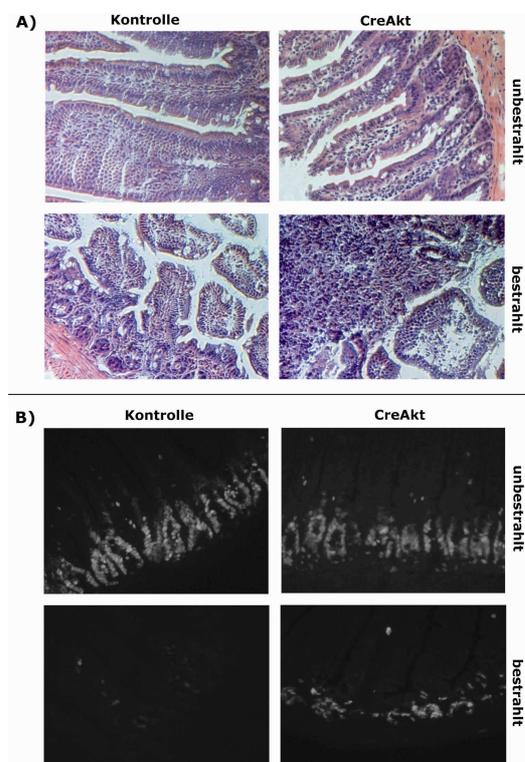


**Abb.3.18: Die transgene Akt wird in CreAkt-Mäusen darmspezifisch exprimiert und ist durch Tamoxifen aktivierbar.**

Western-Blot Analyse von Proteinlysaten aus Jejunum- und Kontrollgewebe (Leber) von unbehandelten oder mit Tamoxifen injizierten Tieren. Tubulin: Ladekontrolle (55 kDa), phos: phosphoryliert, tmaAkt: transgene Akt, HA-AK: HA-Tag Antikörper, Tam: Tamoxifen. **(A)** Die endogene Akt (60 kDa) wird in allen Geweben exprimiert. Die transgene Akt (90 kDa) ist nur in CreAkt-Tieren detektierbar und wird nur nach Behandlung mit Tamoxifen phosphoryliert (anti-phospho-Akt-Ser473). **(B)** Nachweis der tmaAkt mit anti-HA-Antikörper. Die Stärke der Phosphorylierung ist von der Tamoxifen-Dosis abhängig. **(C)** Eine verstärkte Phosphorylierung der P70S6 Kinase im Jejunum von mit Tamoxifen behandelten CreAkt-Tieren zeigt die *in vivo* Funktionalität der aktivierten tmaAkt.

### 3.2.2 Induktion von Stress in CreAkt-Mäusen

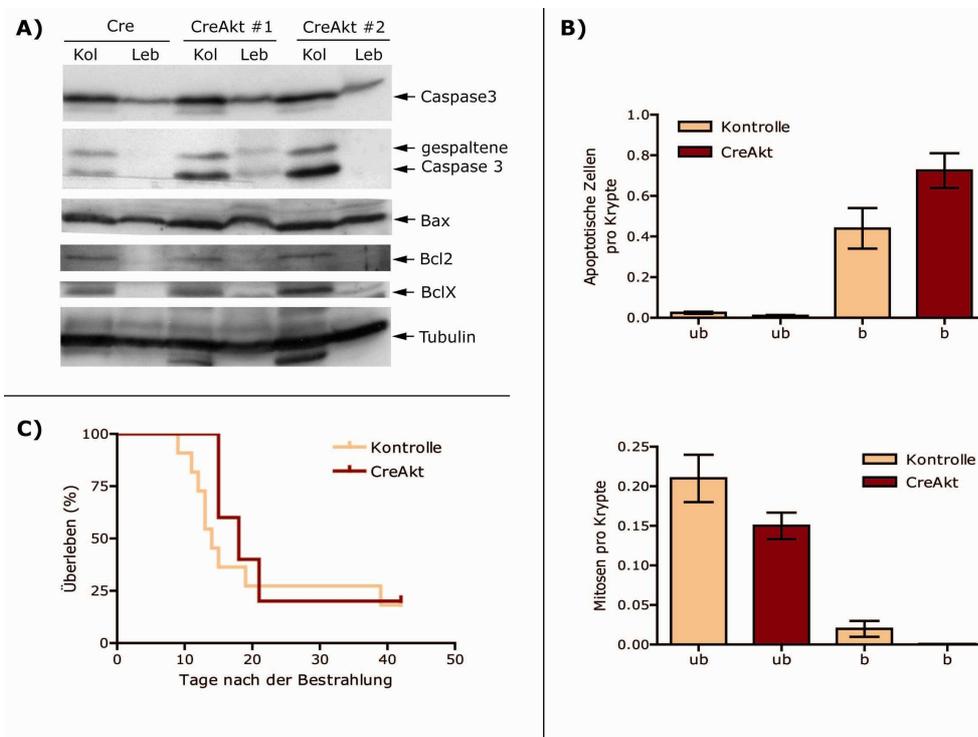
Mäuse mit aktivierter Akt zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Es ist bekannt, dass Akt als „Überlebenskinase“ in Stresssituationen aktiviert wird und aktivierte Akt *in vitro* die Apoptose nach radioaktiver Bestrahlung reduziert (Tessner et al., 2004). Um zu untersuchen, ob auch *in vivo* dieser Effekt zu beobachten ist, wurden CreAkt- und Kontroll-Mäuse mit 10 Gray, einer letalen Dosis, bestrahlt und 24 Stunden danach analysiert (Abb.3.19). Äußerlich zeigten die bestrahlten Tiere keine Veränderungen. Die radioaktive Bestrahlung führte jedoch zur Schädigung des Darmepithels. HE gefärbte Kryoschnitte von Darmgewebe von CreAkt-Tieren zeigten stärkere Gewebeschäden und eine erhöhte Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu den bestrahlten Kontroll-Mäusen (Abb.3.19A). Die Bestrahlung führt zunächst zu einer Proliferationsblockade, der Zellzyklus hält an und die Zellen sterben ab. Die regenerative Proliferation setzt dann nach ca. fünf Tagen wieder ein. Mit dem Proliferationsmarker Ki67 markierte Gewebeschnitte (Immunfluoreszenz-Mikroskopie) zeigten, dass in den bestrahlten Kontroll-Tieren keine Zellen mehr proliferieren. In den CreAkt-Mäusen befanden sich die Zellen noch im Zellzyklus, da noch Ki67 positive Zellen im bestrahlten Gewebe vorhanden waren (Abb.3.19B). Die aktivierte Akt scheint die Zellzyklusblockade, die im Normalfall ausgelöst wird, aufzuheben und die Zellzyklusprogression zu fördern, was zu einer verstärkten Schädigung des Darmepithels beitragen könnte.



**Abb.3.19: Aufhebung der Zellzyklusblockade durch aktivierte Akt und stärkere Gewebeschäden in CreAkt-Mäusen nach radioaktiver Bestrahlung**

Gewebeschnitte von Jejunum aus unbestrahlten und bestrahlten CreAkt- und Kontroll-Mäusen, 24 h nach der Bestrahlung. **(A)** HE-Färbung (200-fache Vergrößerung). Die radioaktive Bestrahlung führt zur Schädigung des Darmepithels. Bestrahlte CreAkt-Mäuse weisen stärkere Gewebeschäden und eine erhöhte Infiltration von Entzündungszellen auf. **(B)** Immunfluoreszenz von mit anti-Ki67-Antikörper markiertem Jejunum (200-fache Vergrößerung). Die proliferierenden Zellen sind vorrangig in den Krypten des Darms lokalisiert. Nach Bestrahlung wird die Proliferation vollständig gestoppt (Kontrolle). In bestrahlten CreAkt-Mäusen sind noch proliferierende Zellen sichtbar.

Des Weiteren konnte in Proteinlysaten von Kolongewebe von bestrahlten CreAkt-Tieren eine stärkere Aktivierung der Caspase 3 detektiert werden. Allerdings war die Expression von anderen pro- (Bax) und anti-apoptotischen (Bcl2, BclX) Proteinen unverändert (Abb.3.20A). Weitere Bestrahlungsexperimente bestätigten die erhöhte Apoptoserate. In den bestrahlten CreAkt-Mäusen war die Anzahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren erhöht und die Zahl der Mitosen in den Krypten verringert (Abb.3.20B). Die verringerte Mitoserate steht im Widerspruch zu der verstärkten Ki67-Färbung in CreAkt-Tieren (Abb.3.19B). Möglicherweise können die Zellen nach Bestrahlung noch in den Zellzyklus gehen, aber werden dann beim G2/M Übergang blockiert. Im Gegensatz zu *in vitro* Ergebnissen (Tessner et al., 2004) verstärkt also die aktivierte Akt nach Bestrahlung die Apoptose. Dieser Effekt hatte allerdings keine Auswirkung auf die Überlebensdauer der CreAkt-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (Abb.3.20C).



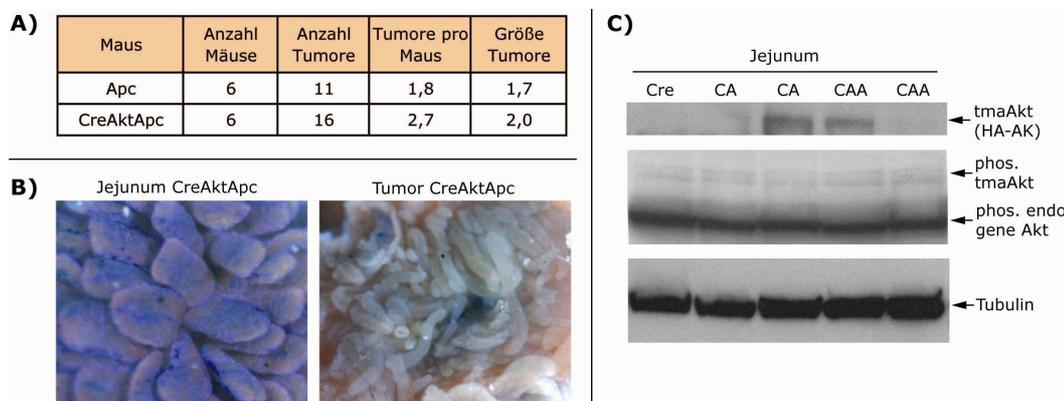
**Abb.3.20: Verstärkte Apoptose in bestrahlten CreAkt-Mäusen**

**(A)** Western-Blot Analyse von Proteinlysaten von Kolon (Kol) und Leber (Leb) aus bestrahlten Cre- und CreAkt-Mäusen. Tubulin: Ladekontrolle (55 kDa), Caspase 3 (35 kDa), #1; #2 = Gewebe von zwei unterschiedlichen

Mäusen. Im Kolon von bestrahlten CreAkt-Mäusen ist eine verstärkte Aktivierung (gespaltene Caspase 3, 17+19 kDa) nachweisbar, was auf eine erhöhte Apoptose hinweist. Andere Proteine wie Bax (pro-apoptotisch, 20 kDa), Bcl2 und BclX (anti-apoptotisch, 26 kDa) werden unverändert exprimiert. **(B)** Auszählung von apoptotischen Zellen und Mitosen pro Krypte auf HE gefärbten Jejunum Gewebeschnitten von bestrahlten (b) und unbestrahlten (ub) Kontroll- und CreAkt-Mäusen (n=3). Nach Bestrahlung findet sich im Darm eine erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen und die Zahl der Mitosen ist reduziert. Dieser Effekt ist in den bestrahlten CreAkt-Mäusen stärker ausgeprägt als in den bestrahlten Kontroll-Mäusen. **(C)** Überlebenskurve (Kaplan-Meier-Analyse) von CreAkt- und Kontroll-Tieren nach der Bestrahlung mit 10 Gray. Es gibt keine Unterschiede in der Überlebensrate bei beiden Versuchsgruppen ( Wt: n=11; CreAkt: n=5).

### 3.2.3 Generierung und Analyse von CreAktApc-Mäusen

Um zu untersuchen, ob eine aktivierte Akt-Kinase zu molekularen und zellulären Veränderungen im etablierten Tumor führt, wurde die CreAkt-Maus mit der  $Apc^{1638N}$ -Maus (Fodde et al., 1994) gekreuzt. Die entstandenen dreifach-transgenen CreAktApc-Tiere entwickelten Tumore im Dünndarm. Dabei waren die Inzidenz, die Anzahl und die Größe der Tumore nicht signifikant gegenüber den  $Apc^{1638N}$ -Mäusen verändert. Die aktive Akt scheint also keinen zusätzlichen Einfluss auf die Tumorentstehung zu haben (Abb.3.21A). Allerdings konnte mit einer X-Gal Färbung von CreAktApc-Tumoren gezeigt werden, dass die transgene Akt nicht in den Läsionen exprimiert wurde (Abb.3.21B). Weiterhin konnte in den Proteinlysaten von Jejunum aus mit Tamoxifen behandelten (dreimal 5 Tage) CreAktApc- und CreAkt-Mäusen (4 Monate alt) nicht in jedem Tier die Expression der transgenen Akt nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung der transgenen Akt wurde in keiner Maus detektiert (Abb.3.21C). Möglicherweise ist die Expression des Transgens durch die Rückkreuzung von CD1 auf C57Bl/6 von Generation zu Generation abgeschwächt, oder epigenetische Effekte verhindern die Expression des Transgens im Tumor. Aus diesem Grund zeigten vermutlich die durchgeführten Experimente keine Unterschiede zwischen den CreAktApc- und den Apc-Mäusen.



**Abb.3.21: Analyse von CreAktApc-Mäusen**

**(A)** Inzidenz, Anzahl und Größe von Tumoren in 4 Monate alten Apc- und CreAktApc-Mäusen. Keine signifikanten Unterschiede in der Tumorentstehung zwischen beiden Mausmodellen. **(B)** X-Gal Färbung von Normalgewebe und einem Tumor aus einer CreAktApc-Maus (50-fache Vergrößerung). Während die Villi des Normalgewebes blau gefärbt sind, kann im Tumor die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase und somit des Transgens nicht nachgewiesen werden. **(C)** Western-Blot Analyse von Proteinlysaten von Jejunum Gewebe aus mit Tamoxifen behandelten Cre-, CreAkt- (CA) und CreAktApc- (CAA) Mäusen. Jede Spur im Gel repräsentiert eine analysierte Maus. Tubulin: Ladekontrolle (55 kDa), tmaAkt: transgene Akt (90 kDa), HA-AK: anti-HA-Antikörper, phos: phosphoryliert. Die transgene Akt kann nur in 1 von 2 CreAkt- bzw. CreAktApc-Mäusen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der tmaAkt scheint in keiner Maus durch die Gabe von Tamoxifen zu erfolgen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Einfluss von onkogenem $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung

#### 4.1.1 Die A33<sup>DN-Bcat</sup>-Maus als Modell für eine schwache Wnt-Aktivierung

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, sondern ist auch sehr häufig bei kolorektalen Karzinomen dereguliert. Das Kolorektalkarzinom ist in Deutschland und anderen Ländern Europas die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache (Schmiegel et al., 2000). Ein Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *APC* oder eine Mutation im Onkogen *CTNNB1* führt zur Aktivierung des Wnt-Signalweges und resultiert in einer veränderten Genexpression, was zur Entstehung von Tumoren führt. Um den Einfluss von onkogenem  $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung im Darm zu untersuchen, wurde die A33<sup>DN-Bcat</sup>(Bcat)-Maus generiert und analysiert. Dieses Mausmodell exprimiert spezifisch amino-terminal verkürztes, onkogenes  $\beta$ -Catenin (DN-Bcat) im Darmepithel unter der Kontrolle des A33-Promotors. Die Deletion betrifft die ersten 131 Aminosäurereste, d.h. im Transgen fehlen die GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsstellen, die die Proteinstabilität kontrollieren, sowie die Bindestelle für alpha-Catenin, die für die adhäsiven Eigenschaften von  $\beta$ -Catenin nötig ist. Die Expression erfolgte gendosisabhängig und war relativ gering (ca. 30%) im Vergleich zum endogenen  $\beta$ -Catenin, was auf die Promotoraktivität des A33-Gens zurückgeführt werden kann. Dagegen exprimieren Mäuse mit  $\Delta$ N131 $\beta$ -Catenin unter der Kontrolle des Calbindin-D9K-Promotors deutlich mehr transgenes als endogenes  $\beta$ -Catenin (Ramagnolo et al., 1999). DN-Bcat konnte mittels subzellulärer Fraktionierung in der Membranfraktion und im Kern lokalisiert werden. Jedoch konnte in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper kein eindeutig nukleäres  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden, da diese Methode möglicherweise nicht sensitiv genug ist. DN-Bcat bindet an E-Cadherin, wie durch Ko-Immunoprecipitations-Versuche nachgewiesen werden konnte. Übereinstimmend damit war ein Teil des Transgens auch an der basolateralen Membran nachweisbar. Störungen in der Zell-Zell-Adhäsion der Epithelzellen in Bcat-Mäusen wurden *in vivo* allerdings nicht beobachtet. Aufgrund der fehlenden alpha-Catenin-Bindestelle konnte DN-Bcat dagegen mit einem anti-alpha-Catenin Antikörper nicht immunpräzipitiert werden. Möglicherweise werden Effekte von DN-Bcat auf die Adhäsion durch die wesentlich höheren Mengen an endogenem, funktionsfähigem  $\beta$ -Catenin nivelliert. Aber auch bei einer stärkeren Expression von  $\beta$ -Catenin ohne die alpha-Catenin-Bindestelle (Ramagnolo et al., 1999) wurde kein auffälliger Adhäsions-Phänotyp beobachtet. In beiden Modellen ist aber das endogene  $\beta$ -Catenin noch vorhanden, so dass kein dominant negativer Effekt durch onkogenes  $\beta$ -Catenin vorzuliegen scheint.

Interessanterweise werden in Bcat-Mäusen die klassischen Wnt-Zielgene wie *Cmyc*, *CyclinD1* und *CD44* nicht überexprimiert, wie es bei der Wnt-Aktivierung durch eine *Apc* Mutation in den *Apc*<sup>1638N</sup>- oder *Apc*<sup>Min</sup>-Mäusen (Su et al., 1992; Fodde et al., 1994; Wielenga et al., 1999) der Fall ist. Vermutlich spielt die Stärke der Wnt-Aktivierung für die Transkription der Zielgene eine

entscheidende Rolle. Die relativ geringe Expression von DN-Bcat reicht für eine adäquate Wnt-Aktivierung, wie in den Apc-Modellen, nicht aus. Hingegen ist die Menge an DN-Bcat für die erhöhte Transkription bestimmter anderer Zielgene ausreichend: MMP7 und Cryptdin werden im Dünndarm von Bcat-Mäusen signifikant überexprimiert. Eine Ursache hierfür könnte die unterschiedliche Affinität der Promotoren sein, das heißt, die relativ wenigen DN-Bcat Moleküle im Kern aktivieren leichter die Gene mit höher-affinen Promotoren. Arbeiten von Gustavson und Mitarbeitern bestätigen diese Hypothese (Gustavson et al., 2004). Die Sequenz und Position der TCF-Bindestellen bestimmt das Ausmaß der  $\beta$ -Catenin induzierten Antwort für die Wnt-Zielgene. Einige Promotoren werden sogar speziesabhängig unterschiedlich reguliert, wie etwa der MMP7 Promotor. Das murine und das humane MMP7 Gen sind Zielgene der  $\beta$ -Catenin Transaktivierung, vermittelt durch TCF-Bindestellen im Promotor von MMP7 (Crawford et al., 1999; Brabletz et al., 1999). MMP7, auch Matrylinin genannt, gehört zur Familie der Matrixmetalloproteinasen, die beim Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beteiligt sind. MMP7 wird in 80% der humanen Kolorektalkarzinome überexprimiert, und ist als wichtiger Faktor für das frühe Tumorwachstum bekannt, aber auch für spätere Schritte in der Tumorprogression (Invasion und der Metastasierung) verantwortlich. Der murine und der humane MMP7 Promotor unterscheiden sich in der Anzahl, Position und Sequenz der TCF-Bindestellen. Der murine Promotor enthält eine TCF-Bindestelle (CATCAAGT), die sich in mindestens zwei Nukleotiden von der Sequenz der zwei humanen TCF-Bindestellen (TTTCAAAGG; TTCAAAGT) unterscheidet (Gustavson et al., 2004). Im Darm wird kaum MMP7 exprimiert, allerdings konnte eine MMP7 Expression in murinen Panethzellen beobachtet werden (Wilson et al., 1995), während in humanen Panethzellen keine MMP7 Expression vorliegt (Wilson und Matrisian, 1998). Im Einklang mit der Hypothese, dass die Aktivierung von Promotoren mit niedrig-affinen TCF-Bindestellen eine höhere  $\beta$ -Catenin Expression im Vergleich zu Promotoren mit hoch-affinen TCF-Bindestellen benötigt, steht auch die beobachtete Expression von murinen MMP7 in Panethzellen. In der Maus wird MMP7 in Panethzellen exprimiert, da seine hoch-affine TCF-Bindestelle eine Antwort auf nukleäre  $\beta$ -Catenin Signale erlaubt, während die Promotoraffinität im humanen MMP7 Gen dafür nicht ausreicht (Gustavson et al., 2004). Auch andere promotorspezifisch regulierte Zielgene (Roel et al., 2002; Atcha et al., 2003; Hecht und Stemmler, 2003; Kirmizis et al., 2003) zeigen, dass Wnt-Zielgene auf Grund der Sequenz und Position ihrer TCF-Bindestellen unterschiedlich aktiviert werden können. Promotoren mit hoch-affinen TCF-Bindestellen Sequenzen sind sensitiver für  $\beta$ -Catenin und benötigen daher nur geringe Mengen an nukleärem  $\beta$ -Catenin. Daher können diese Gene bereits im normalen, proliferativen Kompartiment des Dünndarms und in frühen intestinalen Tumorstadien exprimiert werden. Diese Zusammenhänge verdeutlichen, dass der Wnt-Signalweg nicht dem „Alles oder Nichts“-Prinzip folgt, sondern fein eingestellt ist, und einem gegebenen zellulären Kontext angepasst die Expression der Zielgene reguliert.

Immunfluoreszenz-Mikroskopische Analysen von Panethzellmarkern zeigten, dass eine vermehrte Anzahl von Panethzellen mit der verstärkten MMP7- und Cryptdin-Expression in Bcat-Mäusen einhergeht. Die Panethzellen enthalten große sekretorische Granula, die mit verschiedenen antimikrobiellen Proteinen und Peptiden, wie Lysozym und den Cryptdinen gefüllt sind (Porter et al., 2002). Cryptdin-Vorläufer werden in den Panethzellen gebildet und durch MMP7 aktiviert

(Ayabe et al., 2002). Cryptdine sind wie MMP7 Zielgene des  $\beta$ -Catenin/TCF4-Signalweges und besitzen in ihren Promotoren eine hoch-affine TCF-Bindestelle (AACATCAAAGGG) (Van Es et al., 2005). In Bcat-Mäusen verlagert die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin die Differenzierung der Zellen in Richtung Panethzellen, während die Apoptoserate und die Proliferation nicht beeinflusst waren. Interessanterweise zeigten die Mäuse von Harada keine Vermehrung der Panethzellen (Harada et al., 1999). Dass der Wnt-Signalweg einen Einfluss auf die Differenzierung der Epithelzellen ausübt, wurde in mehreren Arbeiten bereits gezeigt. So vermittelt  $\beta$ -Catenin/TCF die korrekte Positionierung der epithelialen Zellen im Wnt-Gradienten entlang der Krypt-Villus Achse durch die Regulation der Expression von Ephrin B (EphB) (Batlle et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Wnt-Signalweg über die Regulation von MMP7 und Cryptdin die Reifung der Panethzellen in den intestinalen Krypten induziert (van Es et al., 2005). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Andreu und Mitarbeitern, die beweisen konnten, dass ein Verlust von Apc die Entwicklung von Panethzellen durch die  $\beta$ -Catenin/TCF vermittelte Aktivierung der Panethzell-spezifischen Cryptdin Gene fördert (Andreu et al., 2005).

Der Notch-Signalweg spielt bei der Zelldifferenzierung eine zum Wnt-Signalweg komplementäre Rolle (Fre et al., 2005; Van Es et al., 2005). So reguliert er über den Transkriptionsfaktor Hes1 die Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen und die Repression der Differenzierung der Stammzellen in neuronalen Zellen (Akazawa et al., 1992; Sasai et al., 1992; Jarriault et al., 1995). Jensen und Kollegen haben berichtet, dass Hes1-defiziente Mäuse während der Entwicklung des Darms eine sehr starke Differenzierung von endokrinen Zellen aufweisen, woraus sich schließen lässt, dass Hes1 an der Inhibition der Zelldifferenzierung von endokrinen Zellen beteiligt ist (Jensen et al., 2000). Weiterhin wird Hes1 eine Rolle bei der Inhibition der Differenzierung und der Verteilung von Panethzellen zugeschrieben (Suzuki et al., 2005). Hes1 inhibiert die Zelldifferenzierung von Darmepithelzellen, indem es die transkriptionale Aktivität von Math1 antagonistisch blockiert (Akazawa et al., 1995). Die verstärkte Wnt-Aktivität hat vermutlich keinen Einfluss auf den Notch-Signalweg in Bcat-Mäusen, da in RT-PCR Experimenten keine Veränderung in der Hes1- und Math1-Expression nachgewiesen werden konnte.

Trotz der vergleichsweise schwachen Wnt-Aktivierung durch DN-Bcat kommt es in den Bcat-Mäusen zur Tumorentstehung. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit gleichem genetischem Hintergrund (C57Bl/6), die keine Tumore im Darmtrakt entwickelten, entstanden in Bcat-Mäusen im Durchschnitt 0,4 makroskopisch erkennbare Läsionen pro Tier mit einer Inzidenz von ca. 30%. Die meisten dieser Tumore waren sehr klein (ca. 1 mm Durchmesser) und im Kolon lokalisiert, jedoch wurden in älteren Mäusen (älter als 22 Monate) auch einige Läsionen im Dünndarm detektiert. Weiterhin korrelierte die Inzidenz mit der dosisabhängigen Expression von DN-Bcat. In homozygoten Bcat-Mäusen war die Entstehung von Tumoren häufiger (35%) als in heterozygoten Tieren (23%). Auch die Neo-Mäuse, die ein nicht rekombiniertes Allel aufweisen, und aufgrund der Stop-Kassette kein DN-Bcat exprimieren und somit als Kontrolltiere dienen sollten, entwickelten Tumore (17% Inzidenz). Ursache dafür war eine schwache Expression („leaky expression“) von DN-Bcat, die trotz der im Allel noch vorhandenen Neo-Kassette erfolgte, wie mittels Immunpräzipitation gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin für die Tumorentstehung ausreichend ist. Andere Mausmodelle mit mutiertem  $\beta$ -Catenin bestätigen dieses Ergebnis, so etwa eine transgene Maus von Ramagnolo und Mitarbeitern (Ramagnolo et al., 1999). Die so genannte  $\Delta N131$ - $\beta$ -Catenin-Maus enthält die gleiche amino-terminale Deletion wie die in diesem Projekt eingesetzte Bcat-Maus, auch hier fehlen also dem Transgen die GSK3 $\beta$ - und die alpha-Catenin Bindestelle. Die  $\Delta N131$ - $\beta$ -Catenin-Mäuse entwickelten schon im jungen Alter (3-4 Wochen) multifokale dysplastische Läsionen im Dünndarm, allerdings keine Tumore im Kolon. Zusätzlich ist in diesen Tieren die Zahl der apoptotischen Zellen in den Villi 3-4 fach höher als in nicht-transgenen Mäusen. Grund für die wesentlich stärkere Tumorentstehung im Vergleich zu den Bcat-Mäusen ist vermutlich die stärkere Expression des Transgens. Mutiertes  $\beta$ -Catenin wird im Dünndarm in wesentlich höheren Mengen als das endogene  $\beta$ -Catenin exprimiert, was auf die stärkere Aktivität der CaBP9K (Calbindin-D9K) Promotorsequenz, die dem Transgen vorgeschaltet ist, zurückzuführen ist. Da der Calbindin Promotor neben den differenzierten Epithelzellen der Villi auch in der Niere aktiv ist, führt die Expression von  $\Delta N131$ - $\beta$ -Catenin zu einer starken Zystenbildung und veränderten Nierenstruktur, was zum frühen Sterben der transgenen Tiere führt. Daher ist dieses Modell ungünstig, um einen langfristigen Einfluss von  $\beta$ -Catenin auf die Tumorentstehung zu untersuchen. Auch das Mausmodell von Harada zeigte, dass die Stärke der Tumorentstehung von der Stärke der Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin abhängt (Harada et al., 1999). Diese Arbeitsgruppe hat das Exon3 des murinen  $\beta$ -Catenin Gens mit LoxP-Sequenzen flankiert, was durch zusätzliche Expression der Cre-Rekombinase zu einem mutierten  $\beta$ -Catenin Protein führt, dem amino-terminal 76 Aminosäurereste fehlen. Exon3 kodiert die Serin- und Threonin-Aminosäurereste, die durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden. Die darmspezifische Expression des mutierten  $\beta$ -Catenins wird durch die Kreuzung mit der Krt1-19Cre-Maus (Zytokeratin 19, Ck19 Gen) oder mit der FabplCre-Maus (rat liver fatty acid binding protein gene) gewährleistet. Diese Mäuse entwickelten im jungen Alter zahlreiche Polypen im Dünndarm (geschätzte 3000 Tumore in den Krt1-19Cre-Mäusen, geschätzte 200-700 Tumore in den FabplCre-Mäusen) und wenige Mikroadenome im Kolon (Harada et al., 1999). Diese extrem starke Tumorentstehung im Vergleich zu den anderen Modellen ist vermutlich nicht über die Stärke der  $\beta$ -Catenin Expression, sondern durch das Fehlen von endogenem  $\beta$ -Catenin erklärbar, da im Modell von Harada die  $\beta$ -Catenin Mutation in das endogene Allel eingeführt wurde. Ein weiterer Unterschied zur Bcat-Maus ist der genetische Hintergrund. Die Mäuse von Harada sind nur 2-3 Generationen auf C57Bl/6 zurückgekreuzt, während Bcat-Mäuse bis zu 7 Generationen mit C57Bl/6-Mäusen verpaart wurden. Keine Belege für eine Tumorentstehung durch  $\beta$ -Catenin konnten in dem Mausmodell von Wong und Mitarbeitern gefunden werden (Wong et al., 1998). In diesem Fall wird humanes, amino-terminal verkürztes  $\beta$ -Catenin ( $\Delta N89$ - $\beta$ -Catenin) im 129/Sv-Hintergrund unter der Kontrolle des Fabpl Promotors exprimiert. Bei dieser Deletion ist die alpha-Catenin-Bindestelle noch vorhanden. 10 Monate alte Tiere zeigten keine neoplastischen Transformationen im Darm. Dafür konnten aber Veränderungen in der Villus-Architektur (Villus-Verzweigung), Proliferation und Migration beobachtet werden, während die Zelldifferenzierung nicht beeinflusst war. Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist möglicherweise, dass in diesem Mausmodell keine Expression des Transgens im Stammzellkompartiment vorlag. Weiterhin ist in diesem Modell, im Gegensatz zu allen anderen hier beschriebenen Modellen, die alpha-Catenin-Bindestelle noch

vorhanden. Alle diese Studien zeigen, dass das genaue Muster der Genexpression (Aktivität und Zeitpunkt) die Initiation der Tumorgenese beeinflusst. Stabile Mutanten von  $\beta$ -Catenin können zur Bildung intestinaler Polypen führen, auch wenn die Interaktion der Zell-Zell Kontakte nicht beeinträchtigt ist; dies bedeutet, dass die Entstehung der Polypen durch die transkriptionelle Regulation des Wnt-Signalweges hervorgerufen wird.

Der Versuch, die Funktion von  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines Knock-out Modells zu untersuchen, scheiterte daran, dass Mäuse, die homozygot für das  $\beta$ -Catenin Null-Allel sind, schon während der frühen Embryogenese sterben (Haegel et al., 1995). Dieses Resultat verdeutlicht die wichtige Rolle des Wnt-Signalweges bei der Embryonalentwicklung.

Die wenigen Läsionen, die im Dünndarm von Bcat-Mäusen entstanden, konnten histopathologisch als Adenome charakterisiert werden. Sie zeigen eine starke Proliferation und veränderte Gewebeorganisation. Vermutlich sind für die Tumorentstehung in Bcat-Mäusen weitere Mutationen erforderlich. So treten beispielsweise in den pVillin-Kras<sup>V12G</sup>-Mäusen in 20% der Läsionen spontane  $\beta$ -Catenin Mutationen auf (Janssen KP., Fsihi H., Robine S., unveröffentlichte Beobachtungen). Allerdings konnten durch LOH- und Sequenzierungs-Analysen in den Tumoren von Bcat-Mäusen keine Mutationen in den Genen Apc, p53, SASH, Kras und Nras detektiert werden. Auffällig ist, dass im Stroma der Tumore im Vergleich zum Normalgewebe Tenascin-C und -W sehr stark überexprimiert wurden, wobei Tenascin-W im Vergleich zu Tenascin-C im Normalgewebe nicht detektiert werden konnte. Während der Karzinogenese werden die Stromazellen durch einen initialen Auslöser, der meist von den Krebszellen kommt, aktiviert, was zu Veränderungen im Stroma und zur Bildung einer „tumorfrendlichen“ Umgebung führt (Bissell und Radisky, 2001). Immer mehr Hinweise zeigen, dass diese Veränderungen im Stroma die Krebsentwicklung beeinflussen und einen Effekt auf die Bösartigkeit des Tumors haben (Mueller und Fusenig, 2004; Beacham und Cukierman, 2005; Bhowmick und Moses, 2005; Kalluri und Zeisberg, 2006). Tumorassozierte Zellen aus dem Stroma exprimieren proliferationsfördernde parakrine Signale für die Epithelzellen (Joesting et al., 2005) und stimulieren die Angiogenese (Yang et al., 2005; Cruz-Munoz et al., 2005). Ein Beispiel hierfür sind die Tenascine. Dies ist eine Familie von Glykoproteinen, die von verschiedenen Bindegewebszellen sekretiert werden (Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Sie tragen zur Struktur der extrazellulären Matrix bei und beeinflussen die Physiologie der Zellen, die im Kontakt mit der Tenascin enthaltenden Umgebung stehen. In humanen kolorektalen Tumoren werden Tenascine in Adenomen und Karzinomen erhöht exprimiert (Hanamura et al., 1997). Die Tenascin Expression korreliert mit der Invasivität und Bösartigkeit des Tumors und wird daher als Indikator für eine schlechte Prognose diskutiert (Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Tenascin-C wird während der foetalen Entwicklung exprimiert und im adulten Gewebe kaum gebildet. Allerdings kommt es unter pathologischen Bedingungen wie Entzündung, Wundheilung und Krebs zur erneuten Expression (Chiquet-Ehrismann und Chiquet 2003). Viele Arbeiten weisen Tenascin-C eine Rolle beim Tumorwachstum, bei der Metastasierung, Angiogenese und Immunsuppression zu (zusammengefasst in Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006). Tenascin-C ist ein Zielgen von aktiviertem  $\beta$ -Catenin in kolorektalen Tumoren und wird besonders stark an Stellen des epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT: epithelial mesenchymal transition) exprimiert. Der EMT kommt meist an der invasiven Front von gut differenzierten humanen

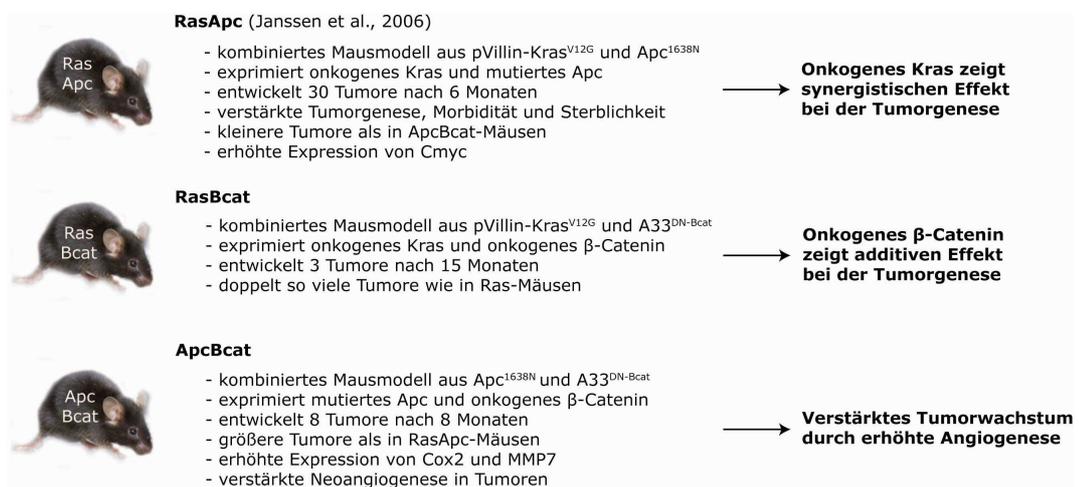
kolorektalen Adenokarzinomen vor, wo es zum Verlust der intrazellulären Kontakte und der Verstärkung der Beweglichkeit der Tumorzellen kommt. Dieser mesenchymal-ähnliche Phänotyp ermöglicht die Zellmigration, die für die Invasion und Metastasierung notwendig ist.  $\beta$ -Catenin beeinflusst möglicherweise durch die Expression von Tenascin-C den Prozess der EMT und die Abschwächung der Adhäsion von kolorektalen Krebszellen. Beide Prozesse könnten zu Invasion und Metastasierung beitragen. Auch die Tenascin-W Expression steht im Zusammenhang mit der Tumorgenese. Tenascin-W findet man normalerweise in der extrazellulären Matrix von Knochen, Muskel und Niere (Chiquet-Ehrismann und Tucker, 2004). Degen und Mitarbeiter fanden eine Tenascin-W Expression im Stroma von Brusttumoren, nicht aber im normalen Drüsengewebe. 81% aller untersuchten Brusttumore waren Tenascin-W positiv, wobei die Expression in früheren Tumorstadien stärker war. Die Mengen an Tenascin-W und -C variieren stark in den unterschiedlichen Tumoren, was auf einen unabhängigen Regulationsmechanismus für ihre Expression hinweist. Die Tenascin-W Expression im aktivierten Tumorstroma begünstigt die Tumorgenese durch die Verstärkung des Migrationsverhaltens der Brustkrebszellen (Degen et al., 2007).

Neben der verstärkten Expression von Tenascin-C und -W wurde eine erhöhte Expression von Osteopontin in Tumoren von Bcat-Mäusen detektiert. Allerdings liegt auf Grund des Materialmangels nur das Ergebnis der RNA Analyse einer einzigen Läsion vor; eine gleichzeitige Analyse der RNA- und Protein-Expression durch Immunhistologie war aufgrund der geringen Tumorgroße technisch nicht möglich. Die stärkere Transkription der Osteopontin mRNA war aber quantitativ mit den qRT-PCR Ergebnissen aus dem Apc Mausmodell (Apc<sup>1638N</sup>, Fodde et al., 1994) gut vergleichbar (Rohde et al., 2007). Auf immunhistologischen Schnitten konnte allerdings keine verstärkte Osteopontin Expression in Tumoren von Bcat-Mäusen detektiert werden. Von drei getesteten Läsionen war eine positiv für Osteopontin (qRT-PCR), die anderen beiden waren negativ (IHC). Im Apc<sup>1638N</sup>-Modell zeigten verschiedene Tumore unterschiedlich starke Osteopontin-Färbungen, und die Standardabweichung bei der qRT-PCR weist ebenfalls auf bedeutende Schwankungen der Osteopontin mRNA Expression in den einzelnen Tumoren hin. In Läsionen von pVillin-Kras<sup>V12G</sup>-Mäusen konnte dagegen keine erhöhte Expression von Osteopontin beobachtet werden (Rohde et al., 2007). Somit stellt Osteopontin ein neuartiges mutmaßliches Zielgen des Wnt-Signalweges in Darmtumoren dar. Osteopontin ist ein sekretiertes Phosphoprotein, das von verschiedenen Zelltypen, unter anderem von epithelialen Zellen, exprimiert wird. Osteopontin wird eine Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Knochenentwicklung, der Regulation des Immunsystems und der Signaltransduktion zugeschrieben (Ding et al., 2002). Neue Ergebnisse bringen Osteopontin durch die Regulation der Zellbeweglichkeit, Invasion und Metastasierung mit Tumorgenese in Verbindung (Wai und Kuo, 2004; Standal et al., 2004; Irby et al., 2004; Wai et al., 2006). Mit Gen-Expressions-Analysen konnte gezeigt werden, dass Osteopontin mit der Tumorprogression von Darmkrebs assoziiert ist (Agrawal et al., 2002; Agrawal et al., 2003). Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass eine hohe Osteopontin Expression bei Darmkrebs-Patienten mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose korreliert, und Osteopontin einen unabhängigen Prognoseparameter für Kolontumore darstellt. In Übereinstimmung mit den Befunden aus den Mausmodellen korrelierte die Expression von

Osteopontin signifikant mit einer erhöhten cytoplasmatischen und nukleären Färbung von  $\beta$ -Catenin in humanen kolorektalen Tumoren (Rohde et al., 2007).

#### 4.1.2 Unterschiedlich starke Tumorinitiation und Tumorprogression in kombinierten Mausmodellen für die kolorektale Karzinogenese

Bcat-Mäuse entwickelten im Vergleich zu bereits beschriebenen Mausmodellen für Darmkrebs wie den Maus-Linien pVillinKras<sup>V12G</sup> (Ras, Janssen et al., 2002) und Apc<sup>1638N</sup> (Apc, Fodde et al., 1994) sehr wenige Tumore, die meist klein waren, ein frühes Tumorstadium repräsentieren und hauptsächlich im Kolon lokalisiert waren. Das heißt, die Expression von onkogenem  $\beta$ -Catenin ist für die Initiation von Tumoren ausreichend, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Mutationen eine Rolle spielen. Die relativ physiologische Expression des transgenen DN-Bcat in Bcat-Mäusen führte zu einer schwachen Wnt-Aktivierung und somit zu einer schwächeren Tumorgenese im Vergleich zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges durch eine Apc-Mutation. Die unterschiedliche Wnt-Aktivierung in Apc- und Bcat-Mäusen wird in der differentiellen Expression der Wnt-Zielgene deutlich. Während in Apc-Mäusen die klassischen Zielgene Cmyc, CyclinD1 und CD44 überexprimiert wurden (Wielenga et al., 1999), reichte die Expression von DN-Bcat anscheinend nur für die Aktivierung von Zielgenen aus, die hoch-affine TCF-Bindestellen in ihren Promotoren aufweisen.



**Abb.4.1: Überblick über die analysierten kombinierten Mausmodelle**

Die gleichzeitige Expression der beiden Onkogene Kras<sup>V12G</sup> und DN-Bcat führte zu einer 2-fach höheren Tumorzahl pro Tier, verglichen mit den einzel-transgenen Ras-Mäusen, während Tumorgroße, Lokalisation der Tumore und das Überleben der Tiere unverändert waren. Dies bedeutet, dass onkogenes  $\beta$ -Catenin zusätzlich die Tumorinitiation verstärkt. Dieser Effekt ist

allerdings längst nicht so drastisch wie in RasApc-Mäusen (Janssen et al., 2006), wo es zu einem mehr als 10-fachen Anstieg der Tumorzahl und zu einer drastisch erhöhten Mortalität kommt. Dies kann wiederum auf die unterschiedlich starke Wnt-Aktivierung in Apc- und Bcat-Mäusen zurückgeführt werden, oder auf Wnt-unabhängige Effekte von Apc, wie etwa die chromosomale Instabilität. Chromosomale Instabilität (CIN) wird häufig in Tumoren gefunden und scheint die Tumorgenese unter anderem mit zu ermöglichen (Rajagopalan et al., 2004). Zahlreiche Arbeiten zeigten, dass Apc auch eine Rolle bei der Teilung der Chromosomen und bei der CIN hat (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Dikovskaya et al., 2004 und 2007; Green und Kaplan, 2004; Tighe et al., 2004; Abal et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Apc Gen strukturelle Abnormalitäten von Chromosomen, Aneuploidie und Abberationen am Spindelapparat verursacht. Außerdem bindet Apc an die Kinetochoren bei der Chromosomenteilung (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Aoki und Mitarbeiter zeigten, dass auch  $\beta$ -Catenin an der Entstehung von CIN beteiligt ist. So erhöht die  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelte Transkription die CIN durch eine Fehlregulation des Spindel-Checkpoints durch die Inhibition von Cdc2 (Aoki et al., 2007). Die Arbeitsgruppe von Nelson zeigte kürzlich, dass  $\beta$ -Catenin direkt an die Zentrosomen des Spindelapparates binden kann, und somit die Teilung der Zentrosomen während der Mitose reguliert (Bahnmanyar et al., 2008). In Primärkulturen von Normalgewebe aus Bcat-Mäusen wurde allerdings keine erhöhte CIN beobachtet. Auch Läsionen von ApcBcat-Tieren wiesen keine höhere CIN im Vergleich zu den einzel-transgenen Apc-Mäusen auf. Dies wurde über die Quantifizierung von Anaphasebrücken in Gewebeschnitten nachgewiesen.

Der Synergismus zwischen onkogenem Ras- und dem Wnt-Signalweg kann auf molekularer Ebene durch die von Kras induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin erklärt werden. Onkogenes Ras löst über die MAPK-Kaskade eine Phosphorylierung von Tyrosinresten von  $\beta$ -Catenin aus, was die Bindung von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin in den Zell-Zellkontakten unterbindet (Shibamoto et al., 1994; Kinch et al., 1995), und dadurch das intrazelluläre  $\beta$ -Catenin erhöht. Dieser Effekt führt allerdings nur in Gegenwart von mutiertem Apc zu einem Anstieg des intrazellulären Pools von  $\beta$ -Catenin, somit ist dieser Ras-vermittelte Effekt in den Bcat-Mäusen nicht zu erwarten. Es wurde beschrieben, dass aktiviertes Ras die Aktivität der GSK3 $\beta$ -Kinase inhibieren kann (Li, J. et al., 2005), was ebenfalls zur Erhöhung des intrazellulären  $\beta$ -Catenin führen könnte.

Eine verstärkte Wnt-Aktivierung wurde durch die Kreuzung der Bcat-Maus mit der Apc-Maus realisiert. Dieses Modell entspricht einer Untergruppe humaner Kolorektalkarzinome, die zwei unabhängige Mutationen in Genen des Wnt-Signalweges aufweisen (Suraweera et al., 2006). Diese Tiere zeigten eine verstärkte Tumorgenese im Vergleich zu den einzel-transgenen Apc-Mäusen, es kommt zu einem 2-fachen Anstieg der Tumorzahl. Jedoch kann die verstärkte Wnt-Aktivierung nicht den Effekt eines aktivierten Ras-Signalweges auf die Tumorentstehung rekapitulieren, da weniger als halb so viele Tumore wie in den RasApc-Mäusen entstehen, die Mortalität geringer, und die Latenz der Tumorbildung deutlich größer ist. Allerdings waren Apc- und ApcBcat-Tumore signifikant größer als RasApc-Läsionen, was auf eine Rolle der Wnt-Aktivierung beim Tumorstadium hinweist. Die Morbidität und Sterblichkeit wird anscheinend überwiegend durch die Anzahl, und weniger durch die Größe der Tumore beeinflusst. RasApc-Mäuse zeigten eine deutlich erhöhte Mortalität im Vergleich zu Apc-Tieren.

Die Aktivierung des Wnt-Signalweges ist also für die Initiation der Tumorentstehung ausreichend, wird aber durch die zusätzliche Aktivierung des Ras-Signalweges synergistisch verstärkt. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch aktiviertes Ras, die über verstärktes nukleäres  $\beta$ -Catenin erfolgt, muss daher andere Auswirkungen auf die Zelle haben als die Aktivierung durch onkogenes  $\beta$ -Catenin; dies bedeutet, dass verschiedene Auslöser zu unterschiedlich starken Wnt-Aktivierungen führen. Dies wird auch durch die unterschiedlichen Expressionsmuster der Wnt-Zielgene in den verschiedenen Mausmodellen bestätigt. CD44 und CyclinD1 sind signifikant in den Apc-, ApcBcat- und RasApc-Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe erhöht. Das heißt, dass eine Apc-Mutation vor allem durch die Aktivierung der klassischen Wnt-Zielgene zur Tumorentstehung beiträgt. In den RasApc-Läsionen ist die Cmyc Expression im Vergleich zu den Apc- und ApcBcat-Läsionen signifikant stärker, was zeigt, dass die Aktivierung der Ras-Signalkaskade zusätzlich die Transkription von Cmyc fördert. Interessanterweise findet man nur in den ApcBcat-Tumoren eine erhöhte Cox2 Expression. Möglicherweise ist für die Transkription von Cox2 eine sehr starke Wnt-Aktivierung nötig, oder es erfolgt eine Stabilisierung der Cox2 mRNA durch  $\beta$ -Catenin (Lee und Jeong, 2006). Die Expression von MMP7 ist nur in Apc- und ApcBcat-Tumoren erhöht. Da die Tumore in beiden Mausmodellen auch größer sind als die von RasApc-Mäusen, scheint die MMP7 Expression mit der Tumorprogression zu korrelieren. Es ist bekannt, dass MMP7 eine wichtige Rolle bei späteren Schritten in der Tumorprogression, wie der Invasion und der Metastasierung, in humanen Kolorektalkarzinomen spielt. Außerdem aktiviert MMP7 die Cryptdin-Vorläufer in den sekretorischen Granula der Panethzellen.

Zusammenfassend zeigen alle Ergebnisse, dass die Expression der verschiedenen Wnt-Zielgene von der Stärke der Wnt-Aktivierung abhängt, die wiederum von den unterschiedlichen Mutationen (mutiertes Apc oder onkogenes Bcat, synergistischer Einfluss von aktiviertem Ras) beeinflusst wird.

Die erhöhte Cox2 Expression in ApcBcat-Tumoren konnte auch mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Proteinebene bestätigt werden. Färbungen mit einem anti-Cox2-Antikörper zeigten eine vermehrte Zahl an Cox2-positiven Zellen im Tumorstroma von ApcBcat-, aber auch in geringerem Ausmaß in RasApc-Mäusen. Cox2 wird anscheinend erhöht exprimiert, wenn die Wnt-Aktivierung besonders stark ist oder zusätzlich die Ras-Signalkaskade aktiviert ist. Die Cyclooxygenasen sind integrale Membranenzyme, die Arachidonsäure in biologisch aktive Eikosanoide umsetzen (DeWitt, 1991; Smith et al., 1994; DeWitt und Smith, 1995). Cox1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert und ist für die Homöostase, also für die physiologische Prostaglandinbiosynthese verantwortlich (DeWitt und Smith, 1988; Yokoyama et al., 1988). Die Cox2 Expression wird durch Mitogene, Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündung und Tumorgenese (Xie et al., 1991; Fletcher et al., 1992; Hla und Neilson, 1992). Erste Belege für eine erhöhte Cox2 Expression in humanen Kolonkarzinomen wurden 1994 erbracht (Eberhart et al., 1994). Weitere Studien zeigten, dass Cox2 in 50% aller kolorektalen Adenome und 85% aller kolorektalen Karzinome überexprimiert wird (Gupta und Dubois, 2001; Marnett und DuBois, 2002). Nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) reduzieren die Anzahl und Größe von Adenomen in Patienten mit FAP Syndrom und Mausmodellen wie der Apc<sup>min</sup>-Maus durch die pharmakologische Inhibition von Cox1 und Cox2 (Torrance et al., 2000). Gesunde Individuen, die regelmäßig NSAIDs

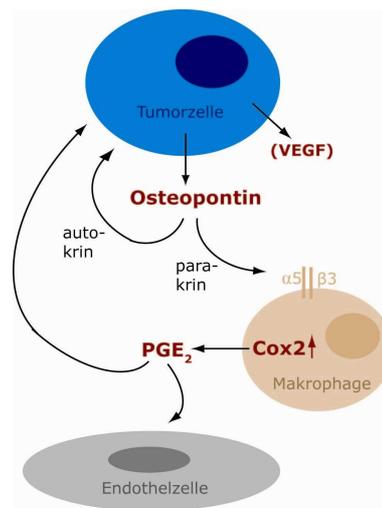
(z.B. Aspirin) nehmen, reduzieren das Risiko für Darmkrebs um 40-50% (Brown und DuBois, 2005). Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob Cox2 Inhibitoren zu einer Reduktion der Tumorgenese in ApcBcat-Mäusen führen. Die Cox2 Expression wird aber nicht nur bei Darmkrebs induziert, sondern auch bei Lungen- (Hida et al., 1998), Pankreas- (Tucker et al., 1999), Magen- (Restimaki et al., 1997), Haut- (Buckman et al., 1998; Pentland et al., 1999) und Brusttumoren (Hwang et al., 1998).

Weiterhin konnte in der Literatur gezeigt werden, dass die Cox2 Expression über den Ras-Signalweg reguliert wird. Onkogenes Ras kann die transkriptionale Aktivierung und Stabilisierung der Cox2 Expression durch verschiedene Mechanismen regulieren (Sheng et al., 1997, 1998, 2000, 2001; Zhang et al., 2000; Araki et al., 2003). Außerdem wird für die Prostaglandin-E2 Produktion die Aktivierung der Ras-MAPK-Signalkaskade benötigt (Wang et al., 2005). Jedoch scheint die Aktivierung von Ras nicht allein für die Induktion der Cox2 Expression auszureichen, denn in Tumoren von Ras-Mäusen war keine erhöhte Cox2 Expression zu finden. In RasApc-Mäusen hingegen lag eine erhöhte Zahl an Cox2 exprimierenden Zellen vor. Die Cox2 positiven Zellen befanden sich sowohl in ApcBcat-, als auch in RasApc-Tieren im Stroma des Tumors und waren nicht epithelialen Ursprungs. Möglicherweise wird die Cox2 Expression durch einen parakrinen Effekt von Epithelzellen in den Stromazellen erhöht, beispielsweise vermittelt durch Osteopontin (Chakraborty et al., 2008). Osteopontin reguliert das Wachstum von Prostatatumoren durch die Regulation der Expression von Cox2. Osteopontin stimuliert die Aktivierung der Proteinkinase Ca (PKCa)/NF- $\kappa$ B-Signalkaskade, die die Cox2 Expression induziert, was wiederum die Prostaglandin-E2 Produktion aktiviert und die Tumorprogression fördert (Jain et al., 2006). Ob die Osteopontin und Cox2 Expression auch in unseren Mausmodellen korreliert, muss auf jeden Fall noch experimentell analysiert werden.

Wie bereits erwähnt, befinden sich die Cox2 positiven Zellen, wie unsere Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, nicht im Epithel, sondern im Tumorstroma. Auch im Mausmodell von Harada wurde eine vermehrte Anzahl von Cox2 positiven Stromazellen beobachtet (Harada et al., 1999). Gegenfärbungen (mit anti-Mac1 und anti-F4/80 Antikörpern) lassen vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um Makrophagen handelt. Zu diesem Thema existieren kontroverse Daten. Viele Studien zeigen, dass die Expression von Cox2 hauptsächlich im Stroma in Makrophagen vorkommt (Takeo 1998; Hull et al., 1999; Shattuck-Brandt et al., 2000). Auch in humanen sporadisch auftretenden kolorektalen Adenomen und Polypen von FAP-Patienten wird Cox2 im Tumorstroma exprimiert (Chapple et al., 2000; Kahn et al., 2001). Im Gegensatz dazu stehen Befunde, wonach die Cox2 Expression im malignen kolorektalen Krebsgewebe hauptsächlich in neoplastischen Epithelzellen vorkommt (Eberhart et al., 1994; Sano et al., 1995). Daher ist es möglich, dass die Cox2 Expression zunächst in den Stromazellen intestinaler Polypen induziert wird, und dann erst die eigentlichen Tumorzellen mit der Cox2 Expression und malignen Progression beginnen. Es ist bekannt, dass gutartige Tumorzellen ohne Unterstützung der Stromazellen nicht wachsen können. Daher fördert die Induktion von Cox2 im Stroma das adenome Zellwachstum durch Produktion von Prostaglandinen, die das Zellwachstum autokrin und parakrin stimulieren, etwa durch die Inhibition der Apoptose (Tsuji und DuBois, 1995) oder durch Stimulation der Angiogenese.

Cox2 stimuliert die Angiogenese *in vitro*, während selektive Cox2 Inhibitoren die Angiogenese in *in vitro* Assays blockieren (Tsuji et al., 1998; Jones et al., 1999). Die Induktion von Cox2 in

Stromazellen von Polypen stimuliert die Angiogenese durch Überexpression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Hoper et al., 1997; Cheng et al., 1998; Fukumura et al., 1998). Diese Studien stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. ApcBcat-Tumoren, die eine stark erhöhte Cox2 Expression aufwiesen, waren stärker durchblutet als Tumore von Ras-, Apc- und RasApc-Mäusen, in denen die Cox2 Expression geringer war. Daher kommt es in ApcBcat-Tumoren vermutlich durch die verstärkte Cox2 Expression zur vermehrten Blutgefäßbildung, was wiederum die Versorgung des Tumors begünstigt und zu einem schnelleren Wachstum des Tumors führt.



**Abb.4.2: Modell für die Interaktionen zwischen Tumorzelle und Stroma**

Tumorzellen produzieren und sekretieren Osteopontin und vermutlich auch VEGF. Osteopontin beeinflusst autokrin die Tumorzelle selbst und zeigt eine parakrine Wirkung auf Zellen im Tumorstroma, wie etwa Makrophagen (Jain et al., 2006; Chakraborty et al., 2008). Die Bindung von Osteopontin erfolgt CD44 oder an den alpha5/beta3-Integrin-Rezeptor und führt zu einer Erhöhung der Cox2 Expression (Chakraborty et al., 2008). Dadurch kommt es zur vermehrten Bildung von Prostaglandinen, die das Zellwachstum autokrin und parakrin stimulieren, wie etwa durch die Inhibition der Apoptose oder durch die Stimulation der Angiogenese, die von aktivierten Endothelzellen ausgelöst wird. VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin-E2.

#### 4.2 Einfluss von aktivierter Akt auf die Tumorentstehung

Eine verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges wird mit der Entstehung vieler Krebsarten in Verbindung gebracht. PI3K und Akt sind Onkogene, deren Amplifizierung in Eierstock-, Brust und Darmkrebs gefunden wurde (Vivanco und Sawyers, 2002), während PTEN als Tumorsuppressor agiert (Li et al., 1997, Steck et al., 1997). Im Gegensatz dazu stehen Vorbefunde aus unserer Arbeitsgruppe, die keine Aktivierung von Akt in Tumoren aus Mausmodellen für Kolorektalkarzinome nachweisen konnten (Janssen et al., 2002 und 2006). Um einen möglichen Einfluss von aktivierter Akt auf die Entstehung von Kolorektalkarzinomen zu untersuchen, wurde die tmaAkt/Z (Akt)-Maus in dieser Arbeit analysiert. Es handelt sich um eine transgene Maus, die

eine durch Tamoxifen aktivierbare Form der Kinase Akt exprimiert. Um eine spezifische Expression des Transgens im Darmepithel zu induzieren, wurde die Akt-Maus mit der pVillinCre-Maus (El Marjou et al., 2004) gekreuzt (CreAkt-Mäuse). Die im Darm exprimierte Akt-Kinase muss zusätzlich durch die Gabe von Tamoxifen aktiviert werden (Kroll et al., 2003). Das Tamoxifen wurde den Mäusen intraperitoneal injiziert (1mg/Tag für 5 Tage), eine Dosis, die bereits in anderen Arbeiten erfolgreich angewendet wurde (Casanova et al., 2002; Forde et al., 2002).

Die erfolgreiche Rekombination konnte in den CreAkt-Mäusen mittels X-Gal-Färbung nachgewiesen werden. Die Expression der Akt war im Jejunum am stärksten und schwächte zum Kolon hin ab. Dieser Effekt ist vermutlich auf die pVillin-Promotoraktivität zurückzuführen, die einen ähnlichen Gradienten aufweist (Robine et al., 1997; Pinto et al., 1999). Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte hauptsächlich in den Krypten und nur vereinzelt in den Villi, obwohl die pVillinCre-Maus eine stärkere Cre-Expression in den differenzierten Zellen (Enterozyten und Becherzellen der Villi) als in den Zellen der Krypten aufweist. Die Färbung der  $\beta$ -Galaktosidase in den CreAkt-Geweben war allerdings wesentlich geringer und nicht so homogen wie in den publizierten pVillinCre/Rosa26R-Mäusen (El Marjou et al., 2004). Die transgene Akt weist vermutlich eine ähnliche Expression wie die  $\beta$ -Galaktosidase auf. Die Analyse von Proteinlysaten zeigte eine schwache Expression der transgenen Akt im Vergleich zur endogenen Kinase. Die Gabe von Tamoxifen scheint die transgene Akt nicht nur zu aktivieren, sondern die dadurch ermöglichte Phosphorylierung stabilisiert das Protein. Ein Nachweis der Phosphorylierung gelang nur durch ein schwaches Signal im Western-Blot. Die erhöhte Gabe von Tamoxifen (3x 5 Tage, Abb.3.16C) führte dagegen zu einer stärkeren Akt-Aktivierung, möglicherweise durch den Stabilisierungseffekt von Tamoxifen auf das Transgen. In einigen CreAkt-Mäusen konnte eine Phosphorylierung der P70S6-Kinase nachgewiesen werden, was die Funktionalität des transgenen Proteins *in vivo* bestätigt.

Jedoch führte die Expression der transgenen, aktivierten Akt nicht zur Bildung von Darmtumoren, und die CreAkt-Tiere zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Das heißt, die Expression von onkogener Akt ist für die Initiation der Tumorgenese im Darmepithel nicht ausreichend. Ähnliche Ergebnisse zeigten Arbeiten an Mausmodellen für Glioblastome. Die Expression von aktivierter Akt alleine reicht nicht aus, um Glioblastome in Mäusen zu induzieren, aber die Koexpression mit aktivem Ras führt zur Entstehung von aggressiven Glioblastomen (Holland et al., 2000). Die Expression von aktivierter Akt in einem anderen Mausmodell (MPAKT-Maus) resultierte dagegen in intraepithelialen Neoplasien in der Prostata auch in Abwesenheit von anderen onkogenen Mutationen (Majumder et al., 2003). Daher könnte die fehlende Tumorgenese in der tmaAkt-Maus auch auf die sehr schwache Expression von aktivierter Akt Kinase zurückzuführen sein.

Da die CreAkt-Mäuse unter normalen Haltungsbedingungen keinen Phänotyp aufwiesen, wurden die Tiere radioaktiver Strahlung ausgesetzt, um zu untersuchen, welche Auswirkung aktivierte Akt unter Stressbedingungen hat. Radioaktive Bestrahlung zerstört die sich teilenden Darmzellen, mit der Ausnahme einiger Stammzellen, die in den Krypten überleben. Diese überlebenden Stammzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regeneration der Krypten nach der Bestrahlung (Pritchard und Watson, 1996). Höhere Bestrahlungsdosen töten mehr Stammzellen und reduzieren die Zahl der regenerativen Krypten. Die Zellen antworten auf einen durch Bestrahlung induzierten

DNA-Schaden mit einer Zellzyklusblockade, DNA-Reparatur oder Apoptose (Schmidt-Ullrich et al., 2000; Dent et al., 2003a; Dent et al., 2003b). Akt wird als „Überlebenskinase“ in Stresssituationen aktiviert und reduziert *in vitro* die Apoptose nach radioaktiver Bestrahlung (Tessner et al., 2004). In CreAkt-Mäusen kam es nach Bestrahlung mit einer letalen Dosis von 10 Gray allerdings zu einer stärkeren Schädigung des Darmepithels und einer erhöhten Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu bestrahlten Kontroll-Tieren. Weiterhin kam es im Darm von CreAkt-Mäusen vermutlich nicht zur Zellzyklusblockade, dafür aber zu einer stärkeren Aktivierung des Apoptose-Markers Caspase 3. Die Expression von anderen pro- und anti-apoptotischen Proteinen blieb unverändert. Tatsächlich war die Zahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren erhöht, während die Zahl der Mitosen in den Krypten verringert war. Anscheinend inhibiert die Expression der transgenen Akt die Zellzyklusblockade nach radioaktiver Bestrahlung. Dadurch kommt es möglicherweise zur stärkeren Schädigung des Darmepithels, denn mehr Zellen gehen in Apoptose. Die Zellzyklusblockade ist ein Schutzmechanismus der Zelle, um zu verhindern, dass DNA-Schäden repliziert werden, und um der DNA-Reparatur die nötige Zeit zu geben. Wird der Zellzyklus bei vermehrter DNA-Schädigung durch Bestrahlung nicht angehalten, häufen sich die Mutationen und die Zelle geht in Apoptose. Diese *in vivo* Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen von Tessner (Tessner et al., 2004). Andere Arbeiten zeigten bisher, dass Akt die Apoptose reduziert und nicht verstärkt. Möglicherweise ist der beobachtete Effekt in CreAkt-Mäusen keine direkte Folge der Expression von transgener Akt. Allerdings kann die Gabe von Tamoxifen als Ursache ausgeschlossen werden, da bei allen Experimenten auch immer eine Kontrollgruppe mit Tamoxifen injiziert wurde.

In Anlehnung an das Mausmodell von Holland und Mitarbeitern (Holland et al., 2000) wurde die CreAkt-Maus mit der Apc-Maus gekreuzt. Diese dreifach-transgenen Tiere (CreAktApc) entwickelten Tumore im Dünndarm. Dabei war die Inzidenz, die Anzahl und Größe der Tumore geringfügig, aber nicht signifikant gegenüber den Apc Mäusen erhöht. Die aktive Akt scheint also keinen nennenswerten zusätzlichen Einfluss auf die Tumorentstehung zu haben. Allerdings könnte auch hier die Expression des Transgens für einen sichtbaren Effekt zu schwach sein, da nicht in jedem CreAkt- bzw. CreAktApc-Tier im Western-Blot die tmaAkt nachgewiesen werden konnte. Die X-Gal Färbung war im Normalgewebe schwächer als in den früheren untersuchten Maus-Generationen, und im Tumorgewebe konnte keine Blaufärbung detektiert werden. Auch der Nachweis der Phosphorylierung, das heißt des aktivierten Zustandes blieb erfolglos. Möglicherweise ist die Expression des Transgens von Generation zu Generation abgeschwächt, wobei der genetische Hintergrund eine Rolle spielen könnte. Die Akt-Mäuse wiesen den genetischen Hintergrund CD1 (outbred) auf (Kroll et al., 2002). In unserem Labor wurden die Tiere dagegen mit C57BL/6-Tieren rückgekreuzt. Dies bedeutet, dass die ersten Generationen von analysierten Mäusen einen höheren genetischen CD1-Anteil hatten, während in den folgenden Generationen der C57BL/6-Anteil anstieg. Falls der genetische Hintergrund die Expression des Transgens beeinflusst, so ist es nachvollziehbar, dass in später analysierten tmaAkt-Generationen die Expression abgeschwächt war, und der Nachweis über die  $\beta$ -Galaktosidase ebenso schwächer war. Dass die aktivierte Akt nicht im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, lag möglicherweise an epigenetischen Veränderungen. Es ist bekannt, dass transgene Promotoren still gelegt werden („silencing“) oder

Promotoren im Tumor zusätzlich hypermethyliert werden, was die Expression des Transgens verhindert (Kato et al., 1996; Robertson et al., 1996).

Um den Einfluss von onkogener Akt auf die Tumorentstehung zu untersuchen, sollte man auf andere Mausmodelle zurückgreifen, die vor allem eine robustere Expression von aktivierter Akt aufweisen. Um die erwähnten „Silencing“-Effekte zu vermeiden, sollte auf eine Knock-in-Strategie im endogenen Akt-Lokus zurückgegriffen werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### 5.1 Zusammenfassung

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, und ist auch sehr häufig bei kolorektalen Karzinomen fehlreguliert. Ein Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *APC* oder eine Mutation im Onkogen *CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin) führt zur Aktivierung des Wnt-Signalweges und resultiert in einer veränderten Genexpression und Tumorbildung. Zusätzlich spielt mutiertes *Apc* auch eine Rolle bei der Entstehung von chromosomaler Instabilität. Allerdings ist noch unklar, welche Effekte von mutiertem *Apc*, die für die Tumorentstehung letztlich verantwortlich sind, von  $\beta$ -Catenin abhängig oder unabhängig sind. Um die gewebespezifischen Effekte von mutiertem  $\beta$ -Catenin zu untersuchen, wurde ein Mausmodell analysiert, das eine amino-terminal verkürzte, onkogene Form von  $\beta$ -Catenin im Darmepithel exprimiert (DN-Bcat). Die  $A33^{DN-Bcat}$ -Maus zeigte eine vergleichsweise schwache Wnt-Aktivierung, die allerdings für eine spontane Tumorentstehung im Darmtrakt ausreichend war. Interessanterweise wurden in den  $A33^{DN-Bcat}$ -Mäusen nur bestimmte Wnt-Zielgene verändert exprimiert, darunter *MMP7* und *Cryptdin*. Beide Zielgene besitzen hoch-affine TCF-Bindestellen in ihren Promotoren, die bereits auf eine geringe Wnt-Aktivierung ansprechen. Onkogenes  $\beta$ -Catenin verschob die Zelldifferenzierung im Normalgewebe in Richtung der Panethzellen, veränderte aber weder die Proliferation noch die Apoptoserate. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die extrazellulären Matrixproteine Tenascin-C und -W, sowie das sekretierte Phosphoprotein Osteopontin in den Läsionen der  $A33^{DN-Bcat}$ -Mäuse überexprimiert wurden. Zusätzlich wurden zwei neue Mausmodelle generiert durch Kreuzung der  $A33^{DN-Bcat}$ -Maus mit einer Linie, die onkogenes *Kras* exprimiert (*pVillin-Kras<sup>V12G</sup>*, Janssen et al., 2002) (*RasBcat*-Maus), bzw. mit einer Maus, die eine Mutation im *Apc* Locus trägt (*Apc<sup>1638N</sup>*, Fodde et al., 1994) (*ApcBcat*-Maus). Die doppel-transgenen *RasBcat*- und *ApcBcat*-Mäuse zeigten eine Verdopplung der Tumorzahl im Vergleich zu den einzel-transgenen Geschwistern, aber die Tumorgenese war bei weitem nicht so stark erhöht wie in *RasApc*-Mäusen (Janssen et al., 2006). DN-Bcat scheint also einen additiven, aber keinen synergistischen Effekt auf die Tumorgenese zu haben. Es konnte auch keine erhöhte chromosomale Instabilität in Tumoren von Mäusen mit onkogenem  $\beta$ -Catenin beobachtet werden. Hingegen waren Tumore von *ApcBcat*-Mäusen signifikant größer als Tumore aus *RasApc*-Tieren, vermutlich verursacht durch eine erhöhte *Cox2* Expression im Stroma und eine dadurch verstärkte Angiogenese.

Als Beispiel für die Tumorentstehung durch einen Wnt-unabhängigen Signalweg wurde ein Mausmodell analysiert, das darmspezifisch eine induzierbare, transgene Akt-Kinase exprimiert. Diese *CreAkt*-Maus zeigte, dass die Expression von aktivierter Akt im Darmepithel allein nicht ausreicht, um die Tumorbildung zu initiieren. Das gleichzeitige Vorhandensein einer *Apc*-Mutation und aktivierter Akt führte zu einer geringfügig verstärkten Tumorgenese im Darm im Vergleich zu den einzel-transgenen *Apc*-Tieren. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant, was möglicherweise an einer unzureichenden Expression der transgenen Akt lag, bedingt durch epigenetische Veränderungen im transgenen Promotor.

## 5.2 Summary

Wnt signaling is involved in the regulation of cellular proliferation and differentiation. Moreover, the Wnt signalling pathway is misregulated in the majority of colorectal cancers. Loss of function of the APC tumor suppressor gene or mutations in the oncogene *CTNNB1* ( $\beta$ -catenin) cause activation of the Wnt pathway and result in altered gene expression leading to cellular transformation and polyp formation. Furthermore, mutations in Apc represent a candidate cause for chromosomal instability in colorectal cancer. However, the contribution of either  $\beta$ -catenin dependent or independent downstream effects of Apc to tumor formation is not well understood. In order to recapitulate the effects of mutated  $\beta$ -catenin, we have analyzed a genetic mouse model that expresses an amino-terminally truncated, oncogenic version of  $\beta$ -catenin in intestinal epithelia (DN-Bcat). The A33<sup>DN-Bcat</sup> mouse showed a relatively weak Wnt activation, which was nonetheless sufficient to induce tumorigenesis in the intestine. Interestingly, we found that only a specific subset of Wnt-target genes including MMP7 and Cryptdin was differentially expressed in these mice. The promoters of both genes contain high-affinity TCF-binding sites which allow the response to low Wnt activities. Oncogenic  $\beta$ -catenin shifted the cell fate decision towards the paneth cell lineage, but did not influence proliferation and apoptosis. Additionally, we found that the extracellular matrix proteins Tenascin-C and -W, as well as the secreted phosphoprotein Osteopontin were overexpressed in lesions of A33<sup>DN-Bcat</sup> mice. Furthermore, we generated two new mouse models by combining the A33<sup>DN-Bcat</sup> mouse with a strain expressing oncogenic Kras (pVillin-Kras<sup>V12G</sup>, Janssen et al., 2002) (RasBcat mice) or with a murine model which carries a mutation at the Apc locus (Apc<sup>1638N</sup>, Fodde et al., 1994) (ApcBcat mice). The compound RasBcat and ApcBcat animals develop twice as much tumors compared to single transgenic littermates, however, tumorigenesis was not as pronounced as in RasApc mice (Janssen et al. 2006). Thus, DN-Bcat seems to have an additive but not a synergistic effect on tumorigenesis. Additionally, we could not observe an increased chromosomal instability in lesions of mice expressing oncogenic  $\beta$ -catenin. In contrast, tumors of the compound ApcBcat mice were larger than tumors of RasApc mice, most likely due to an overexpression of Cox2 that in turn leads to increased angiogenesis.

To investigate a Wnt-independent tumorigenic signaling pathway, we have analyzed a murine model which expresses an intestine specific, inducible transgenic Akt kinase. This CreAkt mouse demonstrates that the expression of activated Akt in intestinal epithelia was not sufficient to induce tumorigenesis. However, the concomitant presence of mutated Apc and activated Akt in CreAktApc mice led to a minor increase in tumorigenesis in comparison to single transgenic Apc mice. This increase was not significant, which may be due to insufficient expression of the transgenic Akt, which was possibly silenced by epigenetic effects at the promoter of the transgene.

## 6 LITERATUR

- Abal, M., Obrador-Hevia, A., Janssen, K.P., Casadome, L., Menendez, M., Carpentier, S., Barillot, E., Wagner, M., Ansorge, W., Moeslein, G., Fsihi, H., Bezrookove, V., Reventos, J., Louvard, D., Capella, G., Robine, S.:** APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology* (2007), 132: 2448-2458.
- Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A.F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D., Yeatman, T.J.:** Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J.Natl.Cancer Inst.* (2002), 94: 513-521.
- Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A.F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D., Yeatman, T.J.:** Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C.R.Biol.* (2003), 326: 1041-1043.
- Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S., Kageyama, R.:** Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J.Biol.Chem.* (1992), 267: 21879-21885.
- Alberici P.:** The Adenoma-Carcinoma sequence in Colorectal Cancer: Scratching the surface. *Dissertation* (2007), Erasmus-Universitat Rotterdam.
- Alcock, H.E., Stephenson, T.J., Royds, J.A., Hammond, D.W.:** Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes.Cancer* (2003), 37: 369-380.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A.:** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* (1996), 15: 6541-6551.
- Altomare, D.A., Guo, K., Cheng, J.Q., Sonoda, G., Walsh, K., Testa, J.R.:** Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* (1995), 11: 1055-1060.
- Altomare, D.A., Lyons, G.E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J.Q., Testa, J.R.:** Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* (1998), 16: 2407-2411.
- Altomare, D.A., Tanno, S., De, R.A., Klein-Szanto, A.J., Tanno, S., Skele, K.L., Hoffman, J.P., Testa, J.R.:** Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J.Cell Biochem.* (2003), 88: 470-476.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., Alkalay, I.:** Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* (2002), 16: 1066-1076.
- An, H.J., Logani, S., Isacson, C., Ellenson, L.H.:** Molecular characterization of uterine clear cell carcinoma. *Mod.Pathol.* (2004), 17: 530-537.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., Romagnolo, B.:** Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* (2005), 132: 1443-1451.
- Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M., Seno, H., Chiba, T., Oshima, M., Hsieh, C.L., Taketo, M.M.:** Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* (2007), 26: 3511-3520.
- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., Harris, C.C.:** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res.* (2003), 63: 728-734.
- Atcha, F.A., Munguia, J.E., Li, T.W., Hovanes, K., Waterman, M.L.:** A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J.Biol.Chem.* (2003), 278: 16169-16175.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J.:** Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat.Immunol.* (2000), 1: 113-118.

- Backlund, M.G., Mann, J.R., Wang, D., Dubois, R.N.:** Ras up-regulation of cyclooxygenase-2. *Methods Enzymol.* (2005), 407: 401-410.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., Aaronson, S.A. :** Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat.Cell Biol.* (2001), 3: 683-686.
- Bahmanyar, S., Kaplan, D.D., Deluca, J.G., Giddings, T.H., Jr., O'Toole, E.T., Winey, M., Salmon, E.D., Casey, P.J., Nelson, W.J., Barth, A.I.:** beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev.* (2008), 22: 91-105.
- Barbier, M., Attoub, S., Calvez, R., Laffargue, M., Jarry, A., Mareel, M., Altruda, F., Gespach, C., Wu, D., Lu, B., Hirsch, E., Wymann, M.P.:** Tumour biology. Weakening link to colorectal cancer? *Nature* (2001), 413: 796.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., Clevers, H.:** The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* (2001), 20: 4935-4943.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D.:** Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* (1999), 18: 6910-6924.
- Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de, W.M., Pawson, T., Clevers, H.:** Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* (2002), 111: 251-263.
- Bauer, A., Huber, O., Kemler, R.:** Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1998), 95: 14787-14792.
- Beacham, D.A. and Cukierman, E.:** Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin.Cancer Biol.* (2005), 15: 329-341.
- Bellacosa, A., de, F.D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti, P.P., Mancuso, S., Neri, G., Testa, J.R.:** Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int.J.Cancer* (1995), 64: 280-285.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R.:** A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* (1996), 382: 225-230.
- Bhowmick, N.A. and Moses, H.L.:** Tumor-stroma interactions. *Curr.Opin.Genet.Dev.* (2005), 15: 97-101.
- Bird, A.:** The essentials of DNA methylation. *Cell* (1992), 70: 5-8.
- Bissell, M.J. and Radisky, D.:** Putting tumours in context. *Nat.Rev.Cancer* (2001), 1: 46-54.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T.:** Oncogenic kinase signalling. *Nature* (2001), 411: 355-365.
- Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de, V.M., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., Vogelstein, B.:** Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* (1987), 327: 293-297.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., Kirchner, T. :** beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am.J.Pathol.* (1999), 155: 1033-1038.
- Bradley, R.S. and Brown, A.M.:** The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *EMBO J.* (1990), 9: 1569-1575.
- Brannon, M., Brown, J.D., Bates, R., Kimelman, D., Moon, R.T.:** XTcBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development* (1999), 126: 3159-3170.
- Brittan, M. and Wright, N.A.:** The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif.* (2004), 37: 35-53.
- Brodbeck, D., Cron, P., Hemmings, B.A.:** A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J.Biol.Chem.* (1999), 274: 9133-9136.

- Brognaard, J., Clark, A.S., Ni, Y., Dennis, P.A.:** Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* (2001), 61: 3986-3997.
- Brown, J.R. and Dubois, R.N.:** COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J.Clin.Oncol.* (2005), 23: 2840-2855.
- Buckman, S.Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., Pentland, A.P.:** COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* (1998), 19: 723-729.
- Byun, D.S., Cho, K., Ryu, B.K., Lee, M.G., Park, J.I., Chae, K.S., Kim, H.J., Chi, S.G.:** Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int.J.Cancer* (2003), 104: 318-327.
- Cadigan, K.M. and Nusse, R.:** Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* (1997), 11: 3286-3305.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Der, C.J.:** Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* (1998), 17: 1395-1413.
- Cantley, L.C. and Neel, B.G.:** New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999), 96: 4240-4245.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D.R., Sprengel, R., Mantamadiotis, T.:** ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis.* (2002), 34: 208-214.
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Gutkind, J.S.:** Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer chemoprevention: the beta-catenin connection. *Cancer Res.* (2006), 66: 11085-11088.
- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A.:** Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* (1998), 395: 604-608.
- Chakraborty, G., Jain, S., Kundu, G.C.:** Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res.* (2008), 68: 152-161.
- Chan, E.F., Gat, U., McNiff, J.M., Fuchs, E.:** A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat.Genet.* (1999), 21: 410-413.
- Chapple, K.S., Cartwright, E.J., Hawcroft, G., Tisbury, A., Bonifer, C., Scott, N., Windsor, A.C., Guillou, P.J., Markham, A.F., Coletta, P.L., Hull, M.A.:** Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am.J.Pathol.* (2000), 156: 545-553.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A.J.:** A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev.* (1999), 13: 2218-2230.
- Chen, T., Yang, I., Irby, R., Shain, K.H., Wang, H.G., Quackenbush, J., Coppola, D., Cheng, J.Q., Yeatman, T.J.:** Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res.* (2003), 63: 4368-4374.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., Testa, J.R.:** Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1996), 93: 3636-3641.
- Cheng, T., Cao, W., Wen, R., Steinberg, R.H., LaVail, M.M.:** Prostaglandin-E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* (1998), 39: 581-591.
- Cheon, S.S., Cheah, A.Y., Turley, S., Nadesan, P., Poon, R., Clevers, H., Alman, B.A.:** beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2002), 99: 6973-6978.

- Cheyette, B.N., Waxman, J.S., Miller, J.R., Takemaru, K., Sheldahl, L.C., Khlebtsova, N., Fox, E.P., Earnest, T., Moon, R.T.:** Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev.Cell* (2002), 2: 449-461.
- Chiquet-Ehrismann, R. and Chiquet, M.:** Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J.Pathol.* (2003), 200: 488-499.
- Chiquet-Ehrismann, R. and Tucker, R.P.:** Connective tissues: signalling by tenascins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* (2004), 36: 1085-1089.
- Clark, A.S., West, K., Streicher, S., Dennis, P.A.:** Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol.Cancer Ther.* (2002), 1: 707-717.
- Clevers, H.:** Axin and hepatocellular carcinomas. *Nat.Genet.* (2000), 24: 206-208.
- Clevers, H.:** Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* (2006), 127: 469-480.
- Coffer, P.J. and Woodgett, J.R.:** Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur.J.Biochem.* (1991), 201: 475-481.
- Coopersmith, C.M., Chandrasekaran, C., McNevin, M.S., Gordon, J.I.:** Bi-transgenic mice reveal that K-rasVal12 augments a p53-independent apoptosis when small intestinal villus enterocytes reenter the cell cycle. *J.Cell Biol.* (1997), 138: 167-179.
- Cowin, P.:** Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1994), 91: 10759-10761.
- Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P., Matrisian, L.M.:** The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* (1999), 18: 2883-2891.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A.:** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* (1995), 378: 785-789.
- Cruz-Munoz, W., Kim, I., Khokha, R.:** TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* (2006), 25: 650-655.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E.:** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* (1997), 91: 231-241.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E.:** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* (1999), 13: 2905-2927.
- De Lau, W., Barker, N., Clevers, H.:** WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. *Front Biosci.* (2007), 12: 471-491.
- Degen, M., Brellier, F., Kain, R., Ruiz, C., Terracciano, L., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R.:** Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res.* (2007), 67: 9169-9179.
- Del, P.L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G.:** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* (1997), 278: 687-689.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., Dedhar, S.:** Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1998), 95: 11211-11216.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P.B., Hagan, M.P., Grant, S.:** MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* (2003a), 22: 5885-5896.
- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M.P., Grant, S., Schmidt-Ullrich, R.:** Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat.Res.* (2003b), 159: 283-300.

- DeWitt, D. and Smith, W.L.:** Yes, but do they still get headaches? *Cell* (1995), 83: 345-348.
- DeWitt, D.L. and Smith, W.L.:** Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1988), 85: 1412-1416.
- DeWitt, D.L.:** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim.Biophys.Acta* (1991), 1083: 121-134.
- Di, C.A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P.:** Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat.Genet.* (1998), 19: 348-355.
- Di, C.A., Kotsi, P., Peng, Y.F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K.B., Pandolfi, P.P.:** Impaired Fas response and autoimmunity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Science* (1999), 285: 2122-2125.
- Di, C.A., De, A.M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P.:** Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat.Genet.* (2001), 27: 222-224.
- Dikovskaya, D., Newton, I.P., Nathke, I.S.:** The adenomatous polyposis coli protein is required for the formation of robust spindles formed in CSF Xenopus extracts. *Mol.Biol.Cell* (2004), 15: 2978-2991.
- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A., Nathke, I.S.:** Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J.Cell Biol.* (2007), 176: 183-195.
- Ding, Q., Stewart, J., Jr., Prince, C.W., Chang, P.L., Trikha, M., Han, X., Grammer, J.R., Gladson, C.L.:** Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin. *Cancer Res.* (2002), 62: 5336-5343.
- Dooijes, D., van de, W.M., Knippels, L., Clevers, H.:** The Schizosaccharomyces pombe mating-type gene mat-Mc encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein. *J.Biol.Chem.* (1993), 268: 24813-24817.
- Downward, J.:** Cell cycle: routine role for Ras. *Curr.Biol.* (1997), 7: R258-R260.
- Downward, J.:** Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr.Opin.Cell Biol.* (1998), 10: 262-267.
- Eastman, Q. and Grosschedl, R.:** Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr.Opin.Cell Biol.* (1999), 11: 233-240.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., Dubois, R.N.:** Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* (1994), 107: 1183-1188.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., Pollard, J.W., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R.:** Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* (1996), 85: 1125-1134.
- Edelmann, W., Yang, K., Kuraguchi, M., Heyer, J., Lia, M., Kneitz, B., Fan, K., Brown, A.M., Lipkin, M., Kucherlapati, R.:** Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.* (1999), 59: 1301-1307.
- El, M.F., Jansen, K.P., Chang, B.H., 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), 39: 186-193.
- Eng, C.:** PTEN: one gene, many syndromes. *Hum.Mutat.* (2003), 22: 183-198.
- Ermoian, R.P., Furniss, C.S., Lamborn, K.R., Basila, D., Berger, M.S., Gottschalk, A.R., Nicholas, M.K., Stokoe, D., Haas-Kogan, D.A.:** Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin.Cancer Res.* (2002), 8: 1100-1106.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H.:** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* (2001), 411: 342-348.

- Fearnhead, N.S., Britton, M.P., Bodmer, W.F.:** The ABC of APC. *Hum.Mol.Genet.* (2001), 10: 721-733.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B.:** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990), 61: 759-767.
- Fedi, P., Bafico, A., Nieto, S.A., Burgess, W.H., Miki, T., Bottaro, D.P., Kraus, M.H., Aaronson, S.A.:** Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J.Biol.Chem.* (1999), 274: 19465-19472.
- Feinberg, A.P.:** The epigenetics of cancer etiology. *Semin.Cancer Biol.* (2004), 14: 427-432.
- Fletcher, B.S., Kujubu, D.A., Perrin, D.M., Herschman, H.R.:** Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J.Biol.Chem.* (1992), 267: 4338-4344.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van, L.C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., Khan, P.M.,:** A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1994), 91: 8969-8973.
- Fodde, R. and Smits, R.:** Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol.Med.* (2001), 7: 369-373.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., Clevers, H.:** Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat.Cell Biol.* (2001), 3: 433-438.
- Fodde, R.:** The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC. *Nat.Cell Biol.* (2003), 5: 190-192.
- Forde, A., Constien, R., Grone, H.J., Hammerling, G., Arnold, B.:** Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis.* (2002), 33: 191-197.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C.:** PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* (1997), 88: 435-437.
- Fraser, E., Young, N., Dajani, R., Franca-Koh, J., Ryves, J., Williams, R.S., Yeo, M., Webster, M.T., Richardson, C., Smalley, M.J., Pearl, L.H., Harwood, A., Dale, T.C.:** Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J.Biol.Chem.* (2002), 277: 2176-2185.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., rtavanis-Tsakonas, S.:** Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* (2005), 435: 964-968.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de, C.J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M.:** PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat.Rev.* (2004), 30: 193-204.
- Frisk, T., Foukakis, T., Dwight, T., Lundberg, J., Hoog, A., Wallin, G., Eng, C., Zedenius, J., Larsson, C.:** Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* (2002), 35: 74-80.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., Cantley, L.C.:** Phosphoinositide kinases. *Annu.Rev.Biochem.* (1998), 67: 481-507.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., Seed, B.:** Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* (1998), 94: 715-725.
- Gao, N., Flynn, D.C., Zhang, Z., Zhong, X.S., Walker, V., Liu, K.J., Shi, X., Jiang, B.H.:** G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* (2004), 287: C281-C291.
- Garcia, J.M., Silva, J.M., Dominguez, G., Gonzalez, R., Navarro, A., Carretero, L., Provencio, M., Espana, P., Bonilla, F.:** Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast Cancer Res.Treat.* (1999), 57: 237-243.
- Gaspar, C. and Fodde, R.:** APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int.J.Dev.Biol.* (2004), 48: 377-386.

- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., Fuchs, E.:** De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* (1998), 95: 605-614.
- Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., Jaenisch, R.:** Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* (2003), 300: 489-492.
- Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., Noon, M.C. :** Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* (1986), 5: 271-279.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V and in Zusammenarbeit mit dem RobertKoch - Institut:** Krebs in Deutschland Häufigkeit und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken (2006).
- Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R.:** The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* (1992), 69: 185-195.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R., Grosschedl, R.:** Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* (1995), 9: 995-1008.
- Giles, R.H., van Es, J.H., Clevers, H.:** Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* (2003), 1653: 1-24.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., Niehrs, C.:** Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* (1998), 391: 357-362.
- Goel, A., Arnold, C.N., Niedzwiecki, D., Carethers, J.M., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnolli, M.M., Boland, C.R.:** Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* (2004), 64: 3014-3021.
- Green, R.A. and Kaplan, K.B.:** Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J. Cell Biol.* (2003), 163: 949-961.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., Barbacid, M.:** Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* (2003), 4: 111-120.
- Gupta, R.A. and Dubois, R.N.:** Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* (2001), 1: 11-21.
- Gustavson, M.D., Crawford, H.C., Fingleton, B., Matrisian, L.M.:** Tcf binding sequence and position determines beta-catenin and Lef-1 responsiveness of MMP-7 promoters. *Mol. Carcinog.* (2004), 41: 125-139.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., Kemler, R.:** Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* (1995), 121: 3529-3537.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.:** The hallmarks of cancer. *Cell* (2000), 100: 57-70.
- Hanamura, N., Yoshida, T., Matsumoto, E., Kawarada, Y., Sakakura, T.:** Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* (1997), 73: 10-15.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., Taketo, M.M.:** Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* (1999), 18: 5931-5942.
- Hart, M., Concordet, J.P., Lassot, I., Albert, I., del los, S.R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., Polakis, P.:** The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* (1999), 9: 207-210.

- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.:** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* (1998), 281: 1509-1512.
- He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L.M., Barrett, T.A., Hood, L., Wu, H., Li, L.:** PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat. Genet.* (2007), 39: 189-198.
- Heath, J.K., White, S.J., Johnstone, C.N., Catimel, B., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Tu, G.F., Ji, H., Whitehead, R.H., Groenen, L.C., Scott, A.M., Ritter, G., Cohen, L., Welt, S., Old, L.J., Nice, E.C., Burgess, A.W.:** The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1997), 94: 469-474.
- Hecht, A., Vlemingckx, K., Stemmler, M.P., van, R.F., Kemler, R.:** The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* (2000), 19: 1839-1850.
- Hecht, A. and Stemmler, M.P.:** Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J. Biol. Chem.* (2003), 278: 3776-3785.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., Ten, D.P.:** TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* (1997), 390: 465-471.
- Hermiston, M.L., Simon, T.C., Crossman, M.W., Gordon, J.I.:** Model systems for studying cell fate specification and differentiation in the gut epithelium. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. L.R. Johnson (1994), New York: Raven: 521-569.
- Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Takahashi, T.:** Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* (1998), 58: 3761-3764.
- Hill, M.M. and Hemmings, B.A.:** Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* (2002), 93: 243-251.
- Hill, R., Song, Y., Cardiff, R.D., Van, D.T.:** Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* (2005), 123: 1001-1011.
- Hla, T. and Neilson, K.:** Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1992), 89: 7384-7388.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E., Fuller, G.N.:** Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet.* (2000), 25: 55-57.
- Hoper, M.M., Voelkel, N.F., Bates, T.O., Allard, J.D., Horan, M., Shepherd, D., Tuder, R.M.:** Prostaglandins induce vascular endothelial growth factor in a human monocytic cell line and rat lungs via cAMP. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1997), 17: 748-756.
- Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., Beard, J.W.:** Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J. Virol.* (1979), 29: 517-522.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence, M.J., Holcombe, R.F., Waterman, M.L.:** Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* (2001), 28: 53-57.
- Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Chung, W.J., Dannenberg, A.J., Brown, A.M.:** Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.* (1999), 59: 1572-1577.
- Howe, L.R., Crawford, H.C., Subbaramaiah, K., Hassell, J.A., Dannenberg, A.J., Brown, A.M.:** PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* (2001), 276: 20108-20115.
- Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., Nathans, J.:** A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* (1999), 398: 431-436.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., Weis, W.I.:** Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* (1997), 90: 871-882.

- Hull, M.A., Booth, J.K., Tisbury, A., Scott, N., Bonifer, C., Markham, A.F., Coletta, P.L.:** Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. *Br.J.Cancer* (1999), 79: 1399-1405.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J.:** E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J.Cell Biol.* (1994), 127: 2061-2069.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., Levine, E.:** Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* (1998), 90: 455-460.
- Imbert, A., Eelkema, R., Jordan, S., Feiner, H., Cowin, P.:** Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J.Cell Biol.* (2001), 153: 555-568.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L.:** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat.Cell Biol.* (2002), 4: 648-657.
- Irby, R.B., McCarthy, S.M., Yeatman, T.J.:** Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression. *Clin.Exp.Metastasis* (2004), 21: 515-523.
- Ittmann, M.M.:** Chromosome 10 alterations in prostate adenocarcinoma (review). *Oncol.Rep.* (1998), 5: 1329-1335.
- Jain, S., Chakraborty, G., Kundu, G.C.:** The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinase C alpha/c-Src/IkappaB kinase alpha/beta-dependent prostate tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* (2006), 66: 6638-6648.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., Fuchs, E.:** Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* (2003), 422: 317-322.
- Janssen, K.P., el Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., Robine, S.:** Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* (2002), 123: 492-504.
- Janssen, K.P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El, M.F., Smits, R., Louvard, D., Fodde, R., Robine, S.:** APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* (2006), 131: 1096-1109.
- Janssen, K.P., Rohde, F., Martini, M.:** Entstehung und Progression von Kolorektaltumoren: Neue Erkenntnisse zur veränderten Signaltransduktion und Immunmodulation. *Onkologie heute* (2007), 3: 8-10.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., Israel, A.:** Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* (1995), 377: 355-358.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., Madsen, O.D.:** Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat.Genet.* (2000), 24: 36-44.
- Joesting, M.S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S.E., Rubin, J.S., Franco, O.E., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Marker, P.C.:** Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* (2005), 65: 10423-10430.
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., Jacks, T.:** Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* (2001), 410: 1111-1116.
- Johnstone, C.N., Tebbutt, N.C., Abud, H.E., White, S.J., Stenvers, K.L., Hall, N.E., Cody, S.H., Whitehead, R.H., Catimel, B., Nice, E.C., Burgess, A.W., Heath, J.K.:** Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* (2000), 279: G500-G510.
- Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., Tarnawski, A.S.:** Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat.Med.* (1999), 5: 1418-1423.

- Kalluri, R. and Zeisberg, M.:** Fibroblasts in cancer. *Nat.Rev.Cancer* (2006), 6: 392-401.
- Kandel, E.S. and Hay, N.:** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp.Cell Res.* (1999), 253: 210-229.
- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A.:** Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr.Biol.* (1999), 9: 601-604.
- Kaplan, K.B., Burds, A.A., Swedlow, J.R., Bekir, S.S., Sorger, P.K., Nathke, I.S.:** A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat.Cell Biol.* (2001), 3: 429-432.
- Karoui, M., Tresallet, C., Julie, C., Zimmermann, U., Staroz, F., Brams, A., Muti, C., Boulard, C., Robreau, A.M., Puy, H., Malafosse, R., Penna, C., Pruvot, F.R., Thiery, J.P., Boileau, C., Rougier, P., Nordlinger, B., Radvanyi, F., Franc, B., Hofmann-Radvanyi, H.:** Loss of heterozygosity on 10q and mutational status of PTEN and BMP1A in colorectal primary tumours and metastases. *Br.J.Cancer* (2004), 90: 1230-1234.
- Kato, T., Ahmed, M., Yamamoto, T., Takahashi, H., Oohara, M., Ikeda, T., Aida, Y., Katsuki, M., Arakawa, Y., Shikata, T., Esumi, M.:** Inactivation of hepatitis C virus cDNA transgene by hypermethylation in transgenic mice. *Arch.Virol.* (1996), 141: 951-958.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D.:** Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* (2001), 17: 615-675.
- Kawasaki, Y., Sato, R., Akiyama, T.:** Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat.Cell Biol.* (2003), 5: 211-215.
- Khan, K.N., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Soslow, R., Koki, A.T.:** Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon. *Scand.J.Gastroenterol.* (2001), 36: 865-869.
- Kielman, M.F., Rindapaa, M., Gaspar, C., van, P.N., Breukel, C., van, L.S., Taketo, M.M., Roberts, S., Smits, R., Fodde, R.:** Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat.Genet.* (2002), 32: 594-605.
- Kim, E.C. and Lance, P.:** Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol.Clin.North Am.* (1997), 26: 1-17.
- Kim, S.H., Roth, K.A., Moser, A.R., Gordon, J.I.:** Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia. *J.Cell Biol.* (1993), 123: 877-893.
- Kinch, M.S., Clark, G.J., Der, C.J., BurrIDGE, K.:** Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J.Cell Biol.* (1995), 130: 461-471.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.:** Colorectal Tumors. *The genetic basis of human cancer* (1996), Editors: Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.; McGraw-Hill, New York: 565-587.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.:** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* (1996), 87: 159-170.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., Farnham, P.J.:** Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol.Cancer Ther.* (2003), 2: 113-121.
- Kishimoto, H., Hamada, K., Saunders, M., Backman, S., Sasaki, T., Nakano, T., Mak, T.W., Suzuki, A.:** Physiological functions of Pten in mouse tissues. *Cell Struct.Funct.* (2003), 28: 11-21.
- Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K., Nakayama, K.:** An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.* (1999), 18: 2401-2410.
- Knudson, A.G.:** A two-mutation model for human cancer. *Advances in viral oncology* (1987), 7: 1-17.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van, W.D., de, W.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Clevers, H.:** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* (1997), 275: 1784-1787.

- Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., Gerard, G.F.:** Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* (1985), 35: 249-258.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., Basler, K.:** Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* (2002), 109: 47-60.
- Kroll, J., Cobo, P., Sato, T.N.:** Versatile inducible activation system of Akt/PKB signaling pathway in mice. *Genesis*. (2003), 35: 160-163.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T.:** The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* (2000), 16: 279-283.
- Kuhl, M., Geis, K., Sheldahl, L.C., Pukrop, T., Moon, R.T., Wedlich, D.:** Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech.Dev.* (2001), 106: 61-76.
- Laemmli, U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970), 227: 680-685.
- Lane, D.P.:** Worrying about p53. *Curr.Biol.* (1992), 2: 581-583.
- Lauder, A., Castellanos, A., Weston, K.:** c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of T cells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis. *Mol.Cell Biol.* (2001), 21: 5797-5805.
- Lee, H.K. and Jeong, S.:** Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* (2006), 34: 5705-5714.
- Lee, J.I., Soria, J.C., Hassan, K.A., El-Naggar, A.K., Tang, X., Liu, D.D., Hong, W.K., Mao, L.:** Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* (2001), 127: 1441-1445.
- Leslie, N.R., Biondi, R.M., Alessi, D.R.:** Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem.Rev.* (2001), 101: 2365-2380.
- Levy, L., Neveu, C., Renard, C.A., Charneau, P., Branchereau, S., Gauthier, F., Van Nhieu, J.T., Cherqui, D., Petit-Bertron, A.F., Mathieu, D., Buendia, M.A.:** Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *J.Biol.Chem.* (2002), 277: 42386-42393.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R.:** PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* (1997), 275: 1943-1947.
- Li, J., Mizukami, Y., Zhang, X., Jo, W.S., Chung, D.C.:** Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. *Gastroenterology* (2005), 128: 1907-1918.
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C.D., Mao, J., Farr, G.H., III, Sussman, D.J., Jonkers, J., Kimelman, D., Wu, D.:** Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* (1999), 18: 4233-4240.
- Li, Q., Ishikawa, T.O., Oshima, M., Taketo, M.M.:** The threshold level of adenomatous polyposis coli protein for mouse intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* (2005), 65: 8622-8627.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., Slingerland, J.M.:** PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat.Med.* (2002), 8: 1153-1160.
- Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C.:** Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* (2003), 4: 257-262.
- Luongo, C., Moser, A.R., Gledhill, S., Dove, W.F.:** Loss of Apc<sup>+</sup> in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res.* (1994), 54: 5947-5952.

- Lustig, B. and Behrens, J.:** The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* (2003), 129: 199-221.
- Ma, Y.Y., Wei, S.J., Lin, Y.C., Lung, J.C., Chang, T.C., Whang-Peng, J., Liu, J.M., Yang, D.M., Yang, W.K., Shen, C.Y.:** PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* (2000), 19: 2739-2744.
- Maehama, T. and Dixon, J.E.:** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J.Biol.Chem.* (1998), 273: 13375-13378.
- Maira, S.M., Galetic, I., Brazil, D.P., Kaech, S., Ingle, E., Thelen, M., Hemmings, B.A.:** Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* (2001), 294: 374-380.
- Majumder, P.K., Yeh, J.J., George, D.J., Febbo, P.G., Kum, J., Xue, Q., Bikoff, R., Ma, H., Kantoff, P.W., Golub, T.R., Loda, M., Sellers, W.R.:** Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2003), 100: 7841-7846.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., Hanski, C.:** Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999), 96: 1603-1608.
- Mann, J.R., Backlund, M.G., Dubois, R.N.:** Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* (2005), 2: 202-210.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., Niehrs, C.:** LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* (2001), 411: 321-325.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., Niehrs, C.:** Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* (2002), 417: 664-667.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., III, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D.:** Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol.Cell* (2001), 7: 801-809.
- Marchenko, G.N., Marchenko, N.D., Leng, J., Strongin, A.Y.:** Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem.J.* (2002), 363: 253-262.
- Marnett, L.J. and Dubois, R.N.:** COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* (2002), 42: 55-80.
- Mayo, L.D. and Donner, D.B.:** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2001), 98: 11598-11603.
- McCrea, P.D., Turck, C.W., Gumbiner, B.:** A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* (1991), 254: 1359-1361.
- McKay, R.M., Peters, J.M., Graff, J.M.:** The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev.Biol.* (2001), 235: 388-396.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., Moon, R.T.:** Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* (1999), 18: 7860-7872.
- Miller, J.R.:** The Wnts. *Genome Biol.* (2002), 3: REVIEWS3001.
- Moon, R.T., Brown, J.D., Yang-Snyder, J.A., Miller, J.R.:** Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell* (1997), 88: 725-728.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.:** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* (1997), 275: 1787-1790.
- Mueller, M.M. and Fusenig, N.E.:** Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat.Rev.Cancer* (2004), 4: 839-849.

- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsihchlis, P.N., Rosen, N.:** Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* (1998), 273: 29864-29872.
- Munoz, J., Lazcoz, P., Inda, M.M., Nistal, M., Pestana, A., Encio, I.J., Castresana, J.S.:** Homozygous deletion and expression of PTEN and DMBT1 in human primary neuroblastoma and cell lines. *Int.J.Cancer* (2004), 109: 673-679.
- Myers, M.P. and Tonks, N.K.:** PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am.J.Hum.Genet.* (1997), 61: 1234-1238.
- Nagafuchi, A. and Takeichi, M.:** Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* (1989), 1: 37-44.
- Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., Roth, R.A.:** Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J.Biol.Chem.* (1999), 274: 21528-21532.
- Nam, S.Y., Lee, H.S., Jung, G.A., Choi, J., Cho, S.J., Kim, M.K., Kim, W.H., Lee, B.L.:** Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. *APMIS* (2003), 111: 1105-1113.
- Nassif, N.T., Lobo, G.P., Wu, X., Henderson, C.J., Morrison, C.D., Eng, C., Jalaludin, B., Segelov, E.:** PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. *Oncogene* (2004), 23: 617-628.
- Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., White, R.L.:** APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* (2000), 1: 519-523.
- Nicholson, K.M. and Anderson, N.G.:** The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* (2002), 14: 381-395.
- Nusse, R.:** Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* (2001), 411: 255-256.
- Ohue, M., Tomita, N., Monden, T., Fujita, M., Fukunaga, M., Takami, K., Yana, I., Ohnishi, T., Enomoto, T., Inoue, M.,:** A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res.* (1994), 54: 4798-4804.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E.:** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* (2000), 19: 3159-3167.
- Onda, H., Lueck, A., Marks, P.W., Warren, H.B., Kwiatkowski, D.J.:** Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. *J.Clin.Invest* (1999), 104: 687-695.
- Orend, G. and Chiquet-Ehrismann, R.:** Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* (2006), 244: 143-163.
- Orner, G.A., Dashwood, W.M., Blum, C.A., Diaz, G.D., Li, Q., Al Fageeh, M., Tebbutt, N., Heath, J.K., Ernst, M., Dashwood, R.H.:** Response of Apc(min) and A33 (delta N beta-cat) mutant mice to treatment with tea, sulindac, and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat.Res.* (2002), 506-507: 121-127.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H.:** PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* (2004), 9: 667-676.
- Oshima, M. and Taketo, M.M.:** COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr.Pharm.Des* (2002), 8: 1021-1034.
- Ougolkov, A.V., Yamashita, K., Mai, M., Minamoto, T.:** Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* (2002), 122: 60-71.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R.:** The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* (1989), 8: 1711-1717.

- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B.:** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* (1999), 401: 82-85.
- Pandur, P., Maurus, D., Kuhl, M.:** Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays* (2002), 24: 881-884.
- Park, M. and Moon, R.T.:** The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat. Cell Biol.* (2002), 4: 20-25.
- Parsons, D.W., Wang, T.L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J.M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C., Velculescu, V.E.:** Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* (2005), 436: 792.
- Paulus, U., Loeffler, M., Zeidler, J., Owen, G., Potten, C.S.:** The differentiation and lineage development of goblet cells in the murine small intestinal crypt: experimental and modelling studies. *J. Cell Sci.* (1993), 106 ( Pt 2): 473-483.
- Peifer, M., Berg, S., Reynolds, A.B.:** A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* (1994), 76: 789-791.
- Pennica, D., Swanson, T.A., Welsh, J.W., Roy, M.A., Lawrence, D.A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L.A., Deuel, B., Lew, M., Watanabe, C., Cohen, R.L., Melhem, M.F., Finley, G.G., Quirke, P., Goddard, A.D., Hillan, K.J., Gurney, A.L., Botstein, D., Levine, A.J.:** WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1998), 95: 14717-14722.
- Pentland, A.P., Schoggins, J.W., Scott, G.A., Khan, K.N., Han, R.:** Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* (1999), 20: 1939-1944.
- Perez-Tenorio, G. and Stal, O.:** Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br. J. Cancer* (2002), 86: 540-545.
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J.T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M.P., Dedhar, S.:** Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem.* (2001), 276: 27462-27469.
- Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P., Graff, J.M.:** Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* (1999), 401: 345-350.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M.:** The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* (1999), 397: 707-710.
- Pinto, D., Robine, S., Jaisser, F., El Marjou, F.E., Louvard, D.:** Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J. Biol. Chem.* (1999), 274: 6476-6482.
- Polakis, P.:** The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta* (1997), 1332: F127-F147.
- Polakis, P.:** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* (2000), 14: 1837-1851.
- Porter, E.M., Bevins, C.L., Ghosh, D., Ganz, T.:** The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol. Life Sci.* (2002), 59: 156-170.
- Potten, C.S. and Loeffler, M.:** A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. *J. Theor. Biol.* (1987), 127: 381-391.
- Potter, C.J., Pedraza, L.G., Xu, T.:** Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.* (2002), 4: 658-665.
- Potter, M., Sanford, K.K., Parshad, R., Tarone, R.E., Price, F.M., Mock, B., Huppi, K.:** Genes on chromosomes 1 and 4 in the mouse are associated with repair of radiation-induced chromatin damage. *Genomics* (1988), 2: 257-262.

- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.:** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* (1992), 359: 235-237.
- Pretlow, T.P., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Pretlow, T.G., Augenlicht, L.H.:** Spontaneous aberrant crypt foci in Apc1638N mice with a mutant Apc allele. *Am.J.Pathol.* (2003), 163: 1757-1763.
- Prieve, M.G. and Moon, R.T.:** Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mouse mammary epithelial cells. *BMC.Dev.Biol.* (2003), 3: 2.
- Pritchard, D.M. and Watson, A.J.:** Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacol.Ther.* (1996), 72: 149-169.
- Rajagopalan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C.:** Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* (2004), 428: 77-81.
- Reitmair, A.H., Redston, M., Cai, J.C., Chuang, T.C., Bjerknes, M., Cheng, H., Hay, K., Gallinger, S., Bapat, B., Mak, T.W.:** Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Res.* (1996a), 56: 3842-3849.
- Reitmair, A.H., Cai, J.C., Bjerknes, M., Redston, M., Cheng, H., Pind, M.T., Hay, K., Mitri, A., Bapat, B.V., Mak, T.W., Gallinger, S.:** MSH2 deficiency contributes to accelerated APC-mediated intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* (1996b), 56: 2922-2926.
- Reya, T. and Clevers, H.:** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* (2005), 434: 843-850.
- Rimkus, C., Friederichs, J., Rosenberg, R., Holzmann, B., Siewert, J.R., Janssen, K.P.:** Expression of the mitotic checkpoint gene MAD2L2 has prognostic significance in colon cancer. *Int.J.Cancer* (2007), 120: 207-211.
- Ristimaki, A., Honkanen, N., Jankala, H., Sipponen, P., Harkonen, M.:** Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* (1997), 57: 1276-1280.
- Robertson, G., Garrick, D., Wilson, M., Martin, D.I., Whitelaw, E.:** Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res.* (1996), 24: 1465-1471.
- Robine, S., Jaisser, F., Louvard, D.:** Epithelial cell growth and differentiation. IV. Controlled spatiotemporal expression of transgenes: new tools to study normal and pathological states. *Am.J.Physiol* (1997), 273: G759-G762.
- Rockman, S.P., Currie, S.A., Ciavarella, M., Vincan, E., Dow, C., Thomas, R.J., Phillips, W.A.:** Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J.Biol.Chem.* (2001), 276: 45113-45119.
- Roel, G., Hamilton, F.S., Gent, Y., Bain, A.A., Destree, O., Hoppler, S.:** Lef-1 and Tcf-3 transcription factors mediate tissue-specific Wnt signaling during *Xenopus* development. *Curr.Biol.* (2002), 12: 1941-1945.
- Rohde, F., Rimkus, C., Friederichs, J., Rosenberg, R., Marthen, C., Doll, D., Holzmann, B., Siewert, J.R., Janssen, K.P.:** Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int.J.Cancer* (2007), 121: 1717-1723.
- Romagnolo, B., Berrebi, D., Saadi-Keddoucci, S., Porteu, A., Pichard, A.L., Peuchmaur, M., Vandewalle, A., Kahn, A., Perret, C.:** Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin. *Cancer Res.* (1999), 59: 3875-3879.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de, W.M., Destree, O., Clevers, H.:** The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* (1998), 395: 608-612.
- Roose, J. and Clevers, H.:** TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim.Biophys.Acta* (1999), 1424: M23-M37.
- Roose, J., Huls, G., van, B.M., Moerer, P., van der, H.K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., Clevers, H.:** Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* (1999), 285: 1923-1926.

- Roy, H.K., Olusola, B.F., Clemens, D.L., Karolski, W.J., Ratashak, A., Lynch, H.T., Smyrk, T.C.: AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* (2002), 23: 201-205.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., Polakis, P.: Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* (1996), 272: 1023-1026.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (1988), 239: 487-491.
- Saito, T., Oda, Y., Kawaguchi, K., Takahira, T., Yamamoto, H., Tanaka, K., Matsuda, S., Sakamoto, A., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M.: PTEN and other tumor suppressor gene mutations as secondary genetic alterations in synovial sarcoma. *Oncol.Rep.* (2004), 11: 1011-1015.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E.: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* (2004), 304: 554.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashimoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., Hla, T.: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* (1995), 55: 3785-3789.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., van de, W.M., Muncan, V., Winton, D.J., Clevers, H., Clarke, A.R.: Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. *J.Biol.Chem.* (2005), 280: 28463-28467.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., Nakanishi, S.: Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* (1992), 6: 2620-2634.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Horie, Y., Bachmaier, K., Fata, J.E., Li, M., Suzuki, A., Bouchard, D., Ho, A., Redston, M., Gallinger, S., Khokha, R., Mak, T.W., Hawkins, P.T., Stephens, L., Scherer, S.W., Tsao, M., Penninger, J.M.: Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* (2000), 406: 897-902.
- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., Nakamura, Y.: AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat.Genet.* (2000), 24: 245-250.
- Scherberich, A., Tucker, R.P., Samandari, E., Brown-Luedi, M., Martin, D., Chiquet-Ehrismann, R.: Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J.Cell Sci.* (2004), 117: 571-581.
- Schmidt-Ullrich, R.K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R.B., Valerie, K.: Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat.Res.* (2000), 153: 245-257.
- Schmiegel, W., Adler, G., Fruhmorgen, P., Folsch, U., Graeven, U., Layer, P., Petrasch, S., Porschen, R., Pox, C., Sauerbruch, T., Schmoll, H., Zeitz, M.: Colorectal carcinoma: prevention and early detection in an asymptomatic population-prevention in patients at risk-endoscopic diagnosis, therapy and after-care of polyps and carcinomas. *German Society of Digestive and Metabolic Diseases/Study Group for Gastrointestinal Oncology Z.Gastroenterol* (2000), 38: 49-75.
- Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kuhl, M., Schaeffer, H.J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W.: The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev.* (2002), 16: 2073-2084.
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., Shimomura, A.: Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med.Mol.Morphol.* (2007), 40: 68-81.
- Shattuck-Brandt, R.L., Varilek, G.W., Radhika, A., Yang, F., Washington, M.K., Dubois, R.N.: Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* (2000), 118: 337-345.

- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., Gray, J.W.:** PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat.Genet.* (1999), 21: 99-102.
- Sheng, G.G., Shao, J., Sheng, H., Hooton, E.B., Isakson, P.C., Morrow, J.D., Coffey, R.J., Jr., Dubois, R.N., Beauchamp, R.D.:** A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* (1997), 113: 1883-1891.
- Sheng, H., Williams, C.S., Shao, J., Liang, P., Dubois, R.N., Beauchamp, R.D.:** Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J.Biol.Chem.* (1998), 273: 22120-22127.
- Sheng, H., Shao, J., Dixon, D.A., Williams, C.S., Prescott, S.M., Dubois, R.N., Beauchamp, R.D.:** Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J.Biol.Chem.* (2000), 275: 6628-6635.
- Sheng, H., Shao, J., Dubois, R.N.:** K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res.* (2001), 61: 2670-2675.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M., Ito, F.:** Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes.Commun.* (1994), 1: 295-305.
- Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., Kanamaru, R., Kanegae, Y., Saito, I., Nakamura, Y., Shiba, K., Noda, T.:** Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* (1997), 278: 120-123.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J., Arteaga, C.L.:** PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat.Med.* (2002), 8: 1145-1152.
- Shirafuji, Y., Tanabe, H., Satchell, D.P., Henschen-Edman, A., Wilson, C.L., Ouellette, A.J.:** Structural determinants of pro-cryptdin recognition and cleavage by matrix metalloproteinase-7. *J.Biol.Chem.* (2003), 278: 7910-7919.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev, A.:** The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1999), 96: 5522-5527.
- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., Jones, K.A.:** The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* (2006), 20: 586-600.
- Smith, K.J., Johnson, K.A., Bryan, T.M., Hill, D.E., Markowitz, S., Willson, J.K., Paraskeva, C., Petersen, G.M., Hamilton, S.R., Vogelstein, B.,:** The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1993), 90: 2846-2850.
- Smith, W.L., Meade, E.A., DeWitt, D.L.:** Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (1994), 714: 136-142.
- Smits, R., van der Houven van Oordt, Luz, A., Zurcher, C., Jagmohan-Changur, S., Breukel, C., Khan, P.M., Fodde, R.:** Apc1638N: a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology* (1998), 114: 275-283.
- Smits, R., Kielman, M.F., Breukel, C., Zurcher, C., Neufeld, K., Jagmohan-Changur, S., Hofland, N., van, D.J., White, R., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Khan, P.M., Fodde, R.:** Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev.* (1999), 13: 1309-1321.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.:** Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* (1998), 58: 1130-1134.
- Spiegelman, V.S., Slaga, T.J., Pagano, M., Minamoto, T., Ronai, Z., Fuchs, S.Y.:** Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol.Cell* (2000), 5: 877-882.

- Staal, F.J., Noort, M.M., Strous, G.J., Clevers, H.C.:** Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep.* (2002), 3: 63-68.
- Staal, S.P.:** Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1987), 84: 5034-5037.
- Standal, T., Borset, M., Sundan, A.:** Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp.Oncol.* (2004), 26: 179-184.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H., Tavtigian, S.V.:** Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat.Genet.* (1997), 15: 356-362.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., Dove, W.F.:** Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* (1992), 256: 668-670.
- Sun, T.Q., Lu, B., Feng, J.J., Reinhard, C., Jan, Y.N., Fantl, W.J., Williams, L.T.:** PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat.Cell Biol.* (2001), 3: 628-636.
- Suraweera, N., Robinson, J., Volikos, E., Guenther, T., Talbot, I., Tomlinson, I., Silver, A.:** Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int.J.Cancer* (2006), 119: 1837-1842.
- Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., Chiba, T.:** Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2005), 328: 348-352.
- Szeto, W., Jiang, W., Tice, D.A., Rubinfeld, B., Hollingshead, P.G., Fong, S.E., Dugger, D.L., Pham, T., Yansura, D.G., Wong, T.A., Grimaldi, J.C., Corpuz, R.T., Singh, J.S., Frantz, G.D., Devaux, B., Crowley, C.W., Schwall, R.H., Eberhard, D.A., Rastelli, L., Polakis, P., Pennica, D.:** Overexpression of the retinoic acid-responsive gene Stra6 in human cancers and its synergistic induction by Wnt-1 and retinoic acid. *Cancer Res.* (2001), 61: 4197-4205.
- Tada, M., Concha, M.L., Heisenberg, C.P.:** Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin.Cell Dev.Biol.* (2002), 13: 251-260.
- Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S., Niitsu, Y.:** Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* (2001), 121: 599-611.
- Takemaru, K.I. and Moon, R.T.:** The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J.Cell Biol.* (2000), 149: 249-254.
- Taketo, M.M.:** Clinical Significance and potential of Selective Cox-2 Inhibitors. *Eds.Vane, J.R., Botting, R.M., Willam Harvey Press* (1998), 129.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X.:** LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* (2000), 407: 530-535.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., He, X.:** A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol.Cell* (2004), 13: 149-156.
- Tanno, S., Yanagawa, N., Habiro, A., Koizumi, K., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., Testa, J.R., Kohgo, Y.:** Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer Res.* (2004), 64: 3486-3490.
- Taylor, V., Wong, M., Brandts, C., Reilly, L., Dean, N.M., Cowser, L.M., Moodie, S., Stokoe, D.:** 5' phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells. *Mol.Cell Biol.* (2000), 20: 6860-6871.
- Tee, A.R., Fingar, D.C., Manning, B.D., Kwiatkowski, D.J., Cantley, L.C., Blenis, J.:** Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2002), 99: 13571-13576.

- Tessner, T.G., Muhale, F., Riehl, T.E., Anant, S., Stenson, W.F.:** Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J.Clin.Invest* (2004), 114: 1676-1685.
- Testa, J.R. and Bellacosa, A.:** AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2001), 98: 10983-10985.
- Tetsu, O. and McCormick, F.:** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (1999), 398: 422-426.
- Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Musisi, H., Bienz, M.:** A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat.Cell Biol.* (2002), 4: 367-373.
- Tice, D.A., Soloviev, I., Polakis, P.:** Activation of the Wnt pathway interferes with serum response element-driven transcription of immediate early genes. *J.Biol.Chem.* (2002), 277: 6118-6123.
- Tighe, A., Johnson, V.L., Taylor, S.S.:** Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J.Cell Sci.* (2004), 117: 6339-6353.
- Toker, A. and Newton, A.C.:** Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J.Biol.Chem.* (2000), 275: 8271-8274.
- Torrance, C.J., Jackson, P.E., Montgomery, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Wissner, A., Nunes, M., Frost, P., D'Isidoro, C.M.:** Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat.Med.* (2000), 6: 1024-1028.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* (1992), 24: 145-149.
- Tree, D.R., Ma, D., Axelrod, J.D.:** A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin.Cell Dev.Biol.* (2002), 13: 217-224.
- Tsujii, M. and Dubois, R.N.:** Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* (1995), 83: 493-501.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., Dubois, R.N.:** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* (1998), 93: 705-716.
- Tucker, O.N., Dannenberg, A.J., Yang, E.K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J.M., Soslow, R.A., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Koki, A.T., Fahey, T.J., III:** Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* (1999), 59: 987-990.
- Uhrbom, L., Dai, C., Celestino, J.C., Rosenblum, M.K., Fuller, G.N., Holland, E.C.:** Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res.* (2002), 62: 5551-5558.
- Van de, W.M., Sancho, E., Verweij, C., de, L.W., Oving, I., Hurlstone, A., van der, H.K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den, B.M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., Clevers, H.:** The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* (2002), 111: 241-250.
- Van der Houven van Oordt CW, Smits, R., Williamson, S.L., Luz, A., Khan, P.M., Fodde, R., van der Eb, A.J., Breuer, M.L.:** Intestinal and extra-intestinal tumor multiplicities in the Apc1638N mouse model after exposure to X-rays. *Carcinogenesis* (1997), 18: 2197-2203.
- Van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den, B.M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M.M., Clevers, H.:** Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat.Cell Biol.* (2005), 7: 381-386.
- Vane, J.R. and Botting, R.M.:** Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand.J.Rheumatol.Suppl* (1996), 102: 9-21.
- Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M.D.:** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp.Cell Res.* (1999), 253: 239-254.

- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D.R.:** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem.J.* (2000) , 346 Pt 3: 561-576.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., Fusco, A., Santoro, M.:** Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat.Med.* (2002), 8: 1136-1144.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L.:** The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat.Rev.Cancer* (2002), 2: 489-501.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L.:** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.* (1988), 319: 525-532.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.:** The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* (1993), 9: 138-141.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J.:** Surfing the p53 network. *Nature* (2000), 408: 307-310.
- von Kries, J.P., Winbeck, G., Asbrand, C., Schwarz-Romond, T., Sochnikova, N., Dell'Oro, A., Behrens, J., Birchmeier, W.:** Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat.Struct.Biol.* (2000), 7: 800-807.
- Wai, P.Y. and Kuo, P.C.:** The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J.Surg.Res.* (2004), 121: 228-241.
- Wai, P.Y., Guo, L., Gao, C., Mi, Z., Guo, H., Kuo, P.C.:** Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery* (2006), 140: 132-140.
- Wang, D.S., Rieger-Christ, K., Latini, J.M., Moizadeh, A., Stoffel, J., Pezza, J.A., Saini, K., Libertino, J.A., Summerhayes, I.C.:** Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. *Int.J.Cancer* (2000), 88: 620-625.
- Wang, H.Y. and Malbon, C.C.:** Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* (2003), 300: 1529-1530.
- Wang, H.Y. and Malbon, C.C.:** Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors. *Cell Mol.Life Sci.* (2004), 61: 69-75.
- Wang, Y., Macke, J.P., Abella, B.S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nathans, J.:** A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *J.Biol.Chem.* (1996), 271: 4468-4476.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., DiNardo, S.:** arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* (2000), 407: 527-530.
- Weston, C.R. and Davis, R.J.:** The JNK signal transduction pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* (2002), 12: 14-21.
- Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., Pals, S.T.:** Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am.J.Pathol.* (1999), 154: 515-523.
- Wilding, J., Straub, J., Bee, J., Churchman, M., Bodmer, W., Dickson, C., Tomlinson, I., Ilyas, M.:** Cyclin D1 is not an essential target of beta-catenin signaling during intestinal tumorigenesis, but it may act as a modifier of disease severity in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. *Cancer Res.* (2002), 62: 4562-4565.
- Willert, J., Epping, M., Pollack, J.R., Brown, P.O., Nusse, R.:** A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC.Dev.Biol.* (2002), 2: 8.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., III, Nusse, R.:** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* (2003), 423: 448-452.

- Wilson, C.L., Heppner, K.J., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M.:** The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. *Mol.Biol.Cell* (1995), 6: 851-869.
- Wilson, C.L. and Matrisian L.M.:** Matrilysin. *Parks Wc, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press (1998)*, 149-184.
- Wong, M.H., Rubinfeld, B., Gordon, J.I.:** Effects of forced expression of an NH<sub>2</sub>-terminal truncated beta-Catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J.Cell Biol.* (1998), 141: 765-777.
- Wu, H., Goel, V., Haluska, F.G.:** PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* (2003), 22: 3113-3122.
- Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., Simmons, D.L.:** Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1991), 88: 2692-2696.
- Xu, L., Corcoran, R.B., Welsh, J.W., Pennica, D., Levine, A.J.:** WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.* (2000), 14: 585-595.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., Kikuchi, A.:** Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J.Biol.Chem.* (1999), 274: 10681-10684.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Morooka, T., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., Ishikawa, O., Ohigashi, H., Nakamori, S., Monden, M., Aozasa, K.:** Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.* (2004), 10: 2846-2850.
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A.B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R.H., Fuller, J.H., Reinhard, C., Garcia, P.D., Randazzo, F.M., Escobedo, J., Fantl, W.J., Williams, L.T.:** Elevated expression of axin2 and hnkcd mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2001), 98: 14973-14978.
- Yanagawa, S., van, L.F., Wodarz, A., Klingensmith, J., Nusse, R.:** The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev.* (1995), 9: 1087-1097.
- Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J.S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T., Ishimoto, A.:** Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila. *EMBO J.* (2002), 21: 1733-1742.
- Yang, F., Tuxhorn, J.A., Ressler, S.J., McAlhany, S.J., Dang, T.D., Rowley, D.R.:** Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res.* (2005), 65: 8887-8895.
- Yao, R. and Cooper, G.M.:** Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* (1995), 267: 2003-2006.
- Yeatman, T.J. and Chambers, A.F.:** Osteopontin and colon cancer progression. *Clin.Exp.Metastasis* (2003), 20: 85-90.
- Yokoyama, C., Takai, T., Tanabe, T.:** Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* (1988), 231: 347-351.
- Zecchini, V., Domaschek, R., Winton, D., Jones, P.:** Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev.* (2005), 19: 1686-1691.
- Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., Boman, B.M.:** Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* (2001), 61: 8664-8667.
- Zhang, X., Gaspard, J.P., Chung, D.C.:** Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* (2001), 61: 6050-6054.
- Zhang, Z., Sheng, H., Shao, J., Beauchamp, R.D., Dubois, R.N.:** Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells. *Neoplasia.* (2000), 2: 523-530.

- 
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., Hung, M.C.:** Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat.Cell Biol.* (2001a), 3: 245-252.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., Hung, M.C.:** HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat.Cell Biol.* (2001b), 3: 973-982.
- Zhu, Y., Richardson, J.A., Parada, L.F., Graff, J.M.:** Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* (1998), 94: 703-714.
- Ziegler, M.:** Identifizierung und Charakterisierung neuer tumorrelevanter Gene, die unter Kontrolle des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs stehen. *Dissertation* (2004), Ruhr-Universität Bochum.
- Ziemer, L.T., Pennica, D., Levine, A.J.:** Identification of a mouse homolog of the human BTEB2 transcription factor as a beta-catenin-independent Wnt-1-responsive gene. *Mol.Cell Biol.* (2001), 21: 562-574.
- Zuber, J., Tchernitsa, O.I., Hinzmann, B., Schmitz, A.C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., Schafer, R.:** A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat.Genet.* (2000), 24: 144-152.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Über die gebräuchlichen SI- und IUPAC-Einheiten hinaus wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

AB	ApcBcat
Abb.	Abbildung
ACF	Aberrant Crypt Foci
Akt-Maus	tmaAkt/Z-Maus
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Apc-Maus	Apc <sup>1638N</sup> -Maus
APS	Ammoniumperoxidsulfat
β-TrCP	β-Transducin Repeat Containing Protein
Bcat-Maus	A33 <sup>DN-βcat</sup> -Maus
BSA	Rinderserumalbumin
Brg-1	Brahma-related gene 1
CA	CreAkt
CAA	CreAktApc
CaBP9K	Calbindin-D9K Promotor
CAG	β-actin Chicken Promotor
CamKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase II
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIN	chromosomale Instabilität
CKIα/ε	Casein Kinase I α/ε
Cox2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
Cre-Maus	pVillinCre-Maus
CtBP	Carboxy-terminal Binding Protein
CTMP	Carboxy-Terminal Modulation Protein
Cy3	Carboxymethylindocyanin
DAG	Diacylglycerol
DCC	Deleted in Colon Cancer
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dkk	Dickkopf
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleotid-5´-Triphosphat (N=A, C, G, T)
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAP	Familiäres Adenomatous Polyposis
FKS	Fötales Kälberserum
Frat1	Frequently rearranged in T-cell Lymphoma 1
FRPs	Frizzled Related Proteins
g	Erdbeschleunigung; Gramm
GF	Growth Factor
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
Grb2	Growth Factor Receptor-bound protein 2
GSK3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin/Eosin
HMG	High Mobility Group
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
HRP	Horseredish Peroxidase
IHC	Immunhistochemistry
I $\kappa$ B	I $\kappa$ appaB
IKK $\alpha$	I $\kappa$ appaB Kinase $\alpha$
ILK	Integrin Linked Kinase
IP	Immunopräzipitation
i.p.	intraperitoneal
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
JNK	Jun amino-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LOH	Loss of Heterozygosity
LoxP	Locus of crossing over
LRP	LDL Receptor Related Protein
$\mu$	mikro
M	Molar
ml	Milliliter

---

min	Minute(n)
MIN	Mikrosatelliten Instabilität; Multiple Intestinal Neoplasia
mM	Millimolar
mA	Milliampère
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein 3
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
Mut	mutiertes Allel
Neo-Maus	A33 <sup>Neo</sup> -Maus
NFκB	Nuclear Factor kappaB
Nkd	Naked cuticle
NP40	Nonylphenylpolyethylenglycol
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
P70S6K	P70 ribosomale Protein S6 Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	Serine/Threonine Kinase 3'-Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PEA3	Polyoma virus Enhancer A Binding Protein 3
PGE <sup>2</sup>	Prostaglandin E2
PH	Pleckstrin Homolog
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPARδ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10
RA	RasApc
Ras-Maus	pVillin-Kras <sup>V12G</sup> -Maus
RB	RasBcat
RGS	Regulator of G-protein Signaling
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
SAMP	Serin Alanin Methionin Prolin
SDS	Sodium-Dodecylsulfat

sec	Sekunde
Shc	SH2 domain containing transforming protein
SHIP	SH2-containing Inositol Phosphatase
SOS	Son of Sevenless
Tab.	Tabelle
TBP	TATA Binding Protein
TCF	T-Cell Factor
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-isocyanat
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
UEA	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western-Blot
WIF-1	Wnt Inhibitory Factor 1
Wt	Wildtyp-Allel
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-inolyl- $\beta$ -D-Galaktosidase

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Die Primärstruktur von $\beta$ -Catenin	8
Abb.1.2: Vereinfachte schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges	9
Abb.1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Wnt-Signalwege	12
Abb.1.4: Aufbau des menschlichen Dünndarms (Schema)	17
Abb.1.5: Modell der kolorektalen Karzinogenese	20
Abb.1.6: Die veränderte Signaltransduktion im Kolorektalkarzinom	22
Abb.1.7: Mausmodelle für die kolorektale Tumorgenese	26
Abb.1.8: Mechanismus der Akt-Aktivierung	28
Abb.3.1: Knock-in Konstrukt der Bcat-Maus	56
Abb.3.2: Nachweis der spezifischen Expression von DN-Bcat auf RNA-Ebene	56
Abb.3.3: Nachweis der spezifischen Expression von DN-Bcat auf Proteinebene	57
Abb.3.4: DN-Bcat ist im Zellkern und an der Zellmembran lokalisiert	58
Abb.3.5: MMP7 und Cryptdin, nicht aber die „klassischen“ Wnt-Zielgene, sind im Jejunum von Bcat-Mäusen überexprimiert	59
Abb.3.6: Erhöhte Anzahl von Panethzellen in den Krypten von Bcat-Mäusen	61
Abb.3.7: DN-Bcat induziert die Tumorentstehung	62
Abb.3.8: Immunhistochemische Analyse von Tumoren aus Bcat-Mäusen	63
Abb.3.9: Osteopontin mRNA wird in Bcat-Tumoren überexprimiert. Osteopontin Expression als prognostischer Faktor in humanen Kolorektalkarzinomen.	64
Abb.3.10: Generierung der RasBcat- und der ApcBcat-Maus (Schema)	66
Abb.3.11: Unterschiedlich starke Tumorgenese in den verschiedenen Mausmodellen	67
Abb.3.12: Wnt-Zielgene werden in den Mausmodellen unterschiedlich stark exprimiert	69
Abb.3.13: Erhöhte Anzahl an Cox2 exprimierenden Zellen in ApcBcat- und RasApc-Läsionen	71
Abb.3.14: Verstärkte Blutgefäßbildung in Tumoren von ApcBcat-Mäusen	72
Abb.3.15: Spezifische Expression und induzierbare Aktivierung der Akt-Kinase	73
Abb.3.16: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Behandlungen mit Tamoxifen	74
Abb.3.17: Nachweis der gewebsspezifischen tmaAkt-Expression nach erfolgreicher Rekombination in CreAkt-Mäusen	75
Abb.3.18: Die transgene Akt wird in CreAkt-Mäusen darmspezifisch exprimiert und ist durch Tamoxifen aktivierbar.	76
Abb.3.19: Aufhebung der Zellzyklusblockade durch aktivierte Akt und stärkere Gewebeschäden in CreAkt-Mäusen nach radioaktiver Bestrahlung	77
Abb.3.20: Verstärkte Apoptose in bestrahlten CreAkt-Mäusen	78
Abb.3.21: Analyse von CreAktApc-Mäusen	79
Abb.4.1: Überblick über die analysierten kombinierten Mausmodelle	87
Abb.4.2: Modell für die Interaktionen zwischen Tumorzelle und Stroma	91

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen großen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während dieser vier schönen Jahre großartig unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus-Peter Janßen für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Doktorarbeit durchführen zu können und für die Vergabe des interessanten Projektes. Bedanken möchte ich mich vor allem für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während des praktischen als auch des schriftlichen Teils dieser Arbeit und für die ständige Aufmerksamkeit gegenüber allen Fragen und Problemen. Lieber Klaus, auch wenn ich kein Muster-Doktorand war und dich sicher hin und wieder enttäuscht habe, so bin ich doch sehr stolz, diese Arbeit als deine erste Doktorandin gemeistert zu haben.

Herrn Prof. Dr. M. Schemann danke ich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Fakultät. Bei Sylvie Robine (Paris), Matthias Ernst (Melbourne) und Thomas Sato (Texas) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mausmodelle (pVillin-Kras<sup>V12G</sup>, pVillin-Cre, A33<sup>DNBcat</sup> und tmaAkt/Z), ohne die dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kolleginnen der Arbeitsgruppe Janßen für das tolle Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken. Anja, Alexandra, Carmen, Daniela, Larissa, Melanie und Melitta, durch euch hat das Arbeiten im Labor auch Spaß gemacht, wenn es mal mit den Experimenten nicht so lief. Ich danke euch vor allem, dass ihr meinen Ordnungswahn ausgehalten habt. Ein riesengroßes Dankeschön gilt dabei vor allem Dani, denn sie hat mich nicht nur als Kollegin, sondern auch als beste Freundin in den vier Jahren meines Doktorandenlebens begleitet. Dani, ich danke dir für deine Freundschaft und die vielen gemeinsamen lustigen Stunden auch außerhalb des Labors. Auch Alex danke ich für gemeinsame Wanderungen und gemütliche Abende im Hause Gnann. Mela möchte ich vor allem für die humorvolle Begleitung auf Kongressen danken, es war immer schön, eine „Gleichgesinnte“ dabei zu haben. Carmen danke ich für ihre Hilfe bei meinen ersten Kryoschnitten und HE- und Immunhistofärbungen. Es war wirklich sehr hilfreich, einen Profi zur Seite zu haben. Anja möchte ich für ihre super Assistenz beim „Knoten“ danken, was die Isolation von Epithelzellen aus dem Maudarm doch wesentlich erleichtert hat.

Natürlich möchte ich es nicht versäumen, auch Dr. Bernhard Holzmann, Dr. Melanie Laschinger und den dazu gehörigen „Holzfrauen“ zu danken. Romy, Petra, Patricia, Gabriela, Felicitas, Sylvia, Simone, Julia und Tanja, ich danke euch allen für die super Stimmung im Labor und die lustigen Mittagspausen. Vor allem danke ich Felicitas für ihr wo-finde-ich-was-im-Labor-Knowhow und dafür, dass ich auch nach vier Jahren immer noch fragen darf, was wie bestellt wird und wo welcher Durchschlag hingeschickt werden muss. Außerdem möchte ich mich bei Simone für ihre viele Hilfe bedanken. Du warst immer da, wenn ich mal eben schnell ein paar Gewebeschnitte brauchte und hast nicht nur das Herstellen von Paraffinschnitten ermöglicht, sondern mich auch nach einiger Überzeugungskraft in die wunderbare Welt des TissueTek eingeführt.

Für den sportlichen Ausgleich nach der Arbeit bedanke ich mich bei unserer Labor-Nordic-Walking-Gruppe.

Des Weiteren möchte ich meinen Studienkolleginnen aus Marburg danken. Mira, Claudia und Andrea, ihr seid trotz der Entfernungen wichtige Freunde und ward immer eine gute Diskussions- und Hilfequelle bei allen Problemen rund um die Doktorarbeit.

Auch meiner Familie gilt ein großes Dankeschön. Tausend Dank an meine lieben Eltern, die mich stets in all meinen Vorhaben unterstützt und motiviert haben und immer für mich da gewesen sind. Meiner kleinen Schwester Riki danke ich, dass sie immer Zeit zum Quatschen und Rumbödeln hat, und dass sie so ein tolles armes kleines Wesen ist.

Der letzte, aber wichtigste und größte Dank geht an meinen lieben Mann, der für mich in Kauf genommen hat, dass seine Frau all die Jahre nur das halbe Geld nach Hause bringt und mir zusätzlich noch ein -finanziell gesehen- lockeres Doktorandenleben ermöglicht hat. Lieber Tom, was würde ich nur ohne dich machen? Ich danke dir nicht nur für die finanzielle Unterstützung, sondern auch für dein Verständnis, deine Motivation und deine immer währende Hilfe in allen Lebenslagen. Die Jahre mit dir, vor allem unsere „richtigen“ gemeinsamen Jahre hier in München, waren die besten meines Lebens und ich freue mich, dass wir gemeinsam bald eine neue große Herausforderung bewältigen dürfen.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Franziska Rohde (geb. Koch)  
 Geburtsdatum: 13. Juli 1979  
 Geburtsort: Erfurt  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: verheiratet

### Bildungsweg:

1986 - 1991 POS 19 - Friedrich Wolf in Erfurt  
 1991 - 1998 Königin-Luise-Gymnasium in Erfurt  
 Abschluss: Abiturprüfung mit Gesamtnote 1,2

1998 - 2002 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg  
 Hauptfach: Molekularbiologie/Humangenetik  
 Nebenfach: Immunologie

2003 Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg  
 Thema: „Translationskontrolle des Transkriptionsfaktors Sp3“  
 Abschluss: Diplomprüfung mit Gesamtnote 1,0

2004 - Dissertation an der Technischen Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Klinikum rechts der Isar  
 Thema: „Die Rolle von onkogenem Beta-Catenin bei der Entstehung von Kolorektalkarzinomen: Analyse genetisch definierter Mausmodelle“

### Publikationen:

Koch F., Sapetschnig A., Rischitor G., Mennenga T., Suske G.: Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem* (2004), 279:42095-105.

Rohde F., Rimkus C., Friederichs J., Rosenberg R., Marthen C., Doll D., Holzmann B., Siewert J.R., Janssen KP.: Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer* (2007), 121:1717-23.