

Aus der Chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Reissfelder)

Optimierung eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Catherine Herzig

aus Berlin
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Doktorvater: PD Dr. med. Sebastian Schölch

Meinen Eltern

Dres. med. Maren und Marius Herzig

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeines zum kolorektalen Karzinom	1
1.2 Epidemiologie	1
1.3 Stadiengerechte Therapie	1
1.4 Prognose und Prävention.....	2
1.5 Ätiologie	2
1.6 Karzinogenese und molekulare Onkologie	3
1.6.1 <i>APC</i> -Mutation	4
1.6.2 <i>KRAS</i> -Mutation.....	5
1.6.3 <i>TP53</i> -Mutation	5
1.7 Mausmodelle	6
1.7.1 GEMM – Genetically engineered mouse model.....	6
1.7.2 Cre-LoxP-System	7
2. AUFGABENSTELLUNG.....	8
3. MATERIALIEN, TIERMODELL UND METHODEN	11
3.1 Materialien	11
3.1.1 Geräte.....	11
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.4 Reagenzien zur Tumorinduktion	14

3.1.5	Software.....	14
3.2	Tiermodell.....	14
3.3	Methoden.....	17
3.3.1	Literaturrecherche	17
3.3.2	Operationsmethode	17
3.3.3	Koloskopie der tumorbildenden Mäuse.....	19
3.3.4	Überwachung, Töten und Organgewinnung	20
3.3.5	Histologische Aufarbeitung der Organe der Reportertiere mittels Xgal Färbung	20
3.3.6	Einbettung, Schneiden und Färben der Reportertierpräparate.....	22
3.3.7	Histologische Aufarbeitung der Organe der Tumortiere	23
3.3.8	Statistisch-biometrische Verfahren.....	24
4.	ERGEBNISSE	25
4.1	Allgemeines zur Datengewinnung.....	25
4.2	Goldstandard Modell - Adenovirustiere.....	25
4.3	Dosisermittlung Tamoxifen - Reportertiere	27
4.4	Tamoxifenwirkung - Tumortiere.....	31
5.	DISKUSSION	38
5.1	Allgemeines	38
5.2	Methodik und Tiermodell.....	38
5.3	Einsatz der Reportertiere.....	39
5.4	Einsatz der Reagenzien zur Tumorinduktion	40
5.5	Auswahl des Promotors	41
5.6	Einfluss des Alters der Tiere auf die Tumorinduktion	42
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick	43
6.	ZUSAMMENFASSUNG	45
7.	SUMMARY	46

8. LITERATURVERZEICHNIS.....	47
9. DANKSAGUNG.....	54
10. ANHANG	55
10.1 Lebenslauf.....	55
10.2 Erklärung über die Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen der Dissertation	57
10.3 Eidesstattliche Erklärung	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AKP-Maus	Kombiniert mutante Maus mit <i>Apc</i> -Mutation, <i>Kras</i> -Mutation, <i>Tp53</i> -Mutation
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli (Gen)
bp	Basenpaare
CI	confidence interval – Konfidenzintervall
CRC	Colorectal Carcinoma – Kolorektales Karzinom
Cre	Cyclization recombination, Zyklische Rekombinase
DE	Deutschland
ER	Estrogenrezeptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses colorectales Carzinom
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems Revision 10 (Internationale Klassifikation der Krankheiten, Diagnoseverschlüsselungssystem)
Konz.	Konzentration
<i>KRAS</i>	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene, Onkogen, dessen Mutation zur Krebsentstehung führen kann
LI	large intestine - Dickdarm
NP-40	Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol, Tergitol Type NP-40
OHT	4-Hydroxytamoxifen
pfu	plaque-forming units
R	Reportertier
RKI	Robert Koch Institut
SEM	Standard error of the mean - Standardfehler
SI	small intestine - Dünndarm
T	Tumortier
Tam	Tamoxifen
TNM	Tumor, Nodus, Metastase; Stadieneinordnung von Tumoren nach lokaler Ausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasierung
<i>TP53</i>	Tumorsuppressorgen
TUD	Technische Universität Dresden
V	Virustier
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Entwicklung des CRC.....	4
Abbildung 2: Schema des Cre ^{ERT2} -Prinzips.....	9
Abbildung 3: Darstellung des Operationssitus einer Maus unter Analgesie, Narkose und Wärmelagerung.....	19
Abbildung 4: Histologische Darstellung der Tumoren der Virustiere	26
Abbildung 5: Koloskopische Bilder der Tumoren der Virustiere.....	27
Abbildung 6: Grafische Darstellung der Tamoxifenwirkung bei den Reportertieren.....	29
Abbildung 7: Histologische Darstellung der Rekombinationsereignisse der Reportertiere im Dickdarm	30
Abbildung 8: Histologische Darstellung der Rekombinationsereignisse der Reportertiere im Dünndarm.....	31
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Tamoxifenwirkung bei den Tumortieren	34
Abbildung 10: Koloskopische Begutachtung der Tumoren bei den Tumortieren	35
Abbildung 11: Histologische Untersuchung der Tumoren bei den Tumortieren	36
Abbildung 12: Darstellung eines makroskopisch sichtbaren Dünndarmtumors bei einem mit Vehikel behandelten Tumortier nach Organentnahme	36
Abbildung 13: Histologische Darstellung von Tumoren von mit 0µM Tamoxifen behandelten Tumortieren.....	37

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Geräte	11
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	11
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	12
Tabelle 4: Reagenzien zur Tumorinduktion.....	14
Tabelle 5: Verwendete Software	14
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Tiere.....	15
Tabelle 7: Aufsteigende Alkoholreihe zur Gewebeentwässerung.....	21
Tabelle 8: HE Färbung der mit Xgal gefärbten Präparate.....	22
Tabelle 9: HE Färbung der Tumortierorgane.....	23
Tabelle 10: Übersicht der mit dem Adenovirus behandelten Tiere.....	26
Tabelle 11: Übersicht der Rekombinationsereignisse der behandelten Reportertiere	28
Tabelle 12: Übersicht behandelte Tumortiere	32

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeines zum kolorektalen Karzinom

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (engl. Colorectal cancer, CRC) werden in der deutschen Literatur Malignome des Colons (Colon ascendens, transversum, descendens und sigmoideum) und des Rektums zusammengefasst. Die anatomische Grenze zwischen Colon sigmoideum und Rektum – gemessen mit dem starren Rektoskop - verläuft dabei nach europäischen Richtlinien bei einer Distanz von 16 cm ab Anokutanlinie (Herold 2013).

1.2 Epidemiologie

Das CRC war im Jahr 2018 die Tumorentität mit der dritthöchsten Mortalität in westlichen Ländern (Siegel et al. 2018). Mehr als die Hälfte der Fälle trat in den entwickelten Ländern auf, jedoch steigt mit der voranschreitenden Entwicklung und Industrialisierung bisher weniger entwickelter Länder wie Brasilien, China und Indien auch deren Inzidenz des CRC (Holmes 2015).

Trotz verschiedener Präventions- und Früherkennungsmaßnahmen, die in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen haben, sowie verbesserter Diagnostik- und Therapiestandards ist die Mortalität der Erkrankung nach wie vor inakzeptabel hoch. So verstarben beispielsweise im Jahre 2012 in Deutschland 25.972 Menschen an einer bösartigen Neubildung des Darms (nach ICD-10: C18-21) (Kaatsch et al., 2015). Im Mittel erkranken im Laufe ihres Lebens einer von 14 Männern und eine von 18 Frauen an Darmkrebs.

1.3 Stadiengerechte Therapie

Die je nach Ausdehnung, Infiltrationstiefe und Lokalisation teilweise sehr schlechte Prognose der Erkrankung leitet sich auch aus der Tatsache ab, dass viele Tumoren erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt werden (Geißler und Graeven 2005). Dies lässt sich bevorzugt dadurch begründen, dass die Erkrankung oft erst spät symptomatisch wird. Leider können die Patienten aus diesem Grund häufig auch erst spät behandelt werden und hiervon profitieren.

Die Einordnung in die Stadien erfolgt vorwiegend nach der TNM-Klassifikation und UICC (Union internationale contre le cancer). Beide Einteilungen erfassen im weitesten Sinne die Tumorausdehnung und die Metastasierung, welche lokoregionär lymphogen sowie hämatogen (vor allem über das portalvenöse System in die Leber) erfolgt. Etwa 25 % der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Patienten mit einem CRC haben initial (synchrone) Lebermetastasen, weitere 30 % entwickeln im Laufe der Erkrankung metachrone Lebermetastasen (Donadon et al. 2007; Clark und Smith 2014).

Unter Berücksichtigung von onkologischen Grundsätzen und der aktuellen Leitlinien sollte die Therapie des CRC interdisziplinär erfolgen und beinhaltet bei kurativem Ansatz zwingend die onkologische Resektion. Hierbei soll die Operation die komplette mesokolische bzw. mesorektale Exzision (CME bzw. TME) und damit auch die radikale lokoregionäre Lymphadenektomie beinhalten. Der Einsatz von neoadjuvanter und/oder adjuvanter (Radio-)Chemotherapie richtet sich insbesondere nach der Tumorausdehnung und Lokalisation. Die neoadjuvante Therapie dient dabei vornehmlich der Verringerung des Rezidivrisikos und der Verbesserung der Resektabilität, so zum Beispiel dem Sphinktererhalt bei tiefsitzenden Rektumtumoren (Geissler und Graeven 2005; Pox und Schmiegel 2014).

1.4 Prognose und Prävention

Die Prognose des CRC ist abhängig von Tumorausdehnung, Stadieneinteilung und Operabilität. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei etwa 63% (Kaatsch et al. 2015).

Zu bedeutenden Präventionsmaßnahmen zählen ausreichende körperliche Aktivität und der Verzicht auf Tabakkonsum. Außerdem wirkt eine ballaststoffreiche Ernährung protektiv. Untersuchungen wie beispielsweise der fäkale Okkultbluttest und die hohe Koloskopie, einschließlich des koloskopischen Polypenmanagements besitzen einen hohen Stellenwert in der Früherkennung und Prävention der Erkrankung. Diese Maßnahmen leisten einen wertvollen Beitrag an der stetigen Prognoseverbesserung (Pox und Schmiegel 2014).

1.5 Ätiologie

Die Ätiologie und Pathogenese des CRC ist in den letzten Jahren und Jahrzehnten Forschungs- und Diskussionsmittelpunkt zahlreicher Publikationen gewesen und verliert weiterhin kaum an Aktualität. Auch viele experimentelle Ansätze zur Therapie der Erkrankung stützen sich auf Theorien zur Krankheitsentstehung.

Anders als bei einigen anderen Krebsentitäten wie beispielsweise dem Bronchialkarzinom, welche sich zumindest bei einigen Subtypen vornehmlich auf den Risikofaktor des jahrelangen Tabakrauchens zurückführen lassen, liegen beim CRC - neben sicher auch

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

vorhandenen beeinflussenden Umwelt- und Risikofaktoren - insbesondere bei den erblichen Formen FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) und HNPCC (Hereditäres nicht-polypöses Coloncarcinom) genetische Faktoren der Erkrankung zugrunde. Der Großteil der CRC (etwa 70%) ist jedoch auf sporadische, nicht hereditäre Entstehung zurückzuführen (Bates und Mercurio 2005).

1.6 Karzinogenese und molekulare Onkologie

Vor allem der Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ (Jackman und Mayo 1951; Day and Morson 1978) und das Modell der „Multistep-Karzinogenese“ (Vogelstein et al. 1988; Fearon und Vogelstein 1990) liegen im Fokus der Untersuchungen zur Entstehung des CRC (Day und Morson 1978; Vogelstein et al. 1988; Fearon und Vogelstein 1990; Kullmann 2003). Meist entwickelt sich ein Karzinom des Dickdarms aus einem zuvor aus normaler Schleimhaut entstandenen gutartigen Tumor (Adenom, auch Polyp genannt). Die Prävention stützt sich deshalb vornehmlich auf das konsequente Polypenmonitoring und –management (Geissler und Graeven 2005). Die Häufung verschiedener Mutationen zeigt sich für die Initiation und spätere Progression des CRC verantwortlich (Fearon und Vogelstein 1990; Huels und Sansom 2015).

Vorrangige Bedeutung haben hierbei auch Mutationen in verschiedenen Tumorsuppressorgenen und Onkogenen (Fearon und Vogelstein 1990). Der Verlust des *APC*-Gens scheint dabei eine der entscheidenden Rollen zu spielen. Zusätzlich sind auch Mutationen im Protoonkogen *KRAS* und im Tumorsuppressorgen *TP53* regelmäßig an der Karzinogenese beteiligt (Huels und Sansom 2015). Das Auftreten der Mutationen im *APC*-Gen wird allerdings sehr früh und vor dem Auftreten der *KRAS*- und *TP53*-Mutationen beobachtet, weshalb das *APC*-Gen als Gatekeeper der kolorektalen Karzinogenese bezeichnet wurde (Kinzler und Vogelstein 1996).

Offenbar führt jede dieser Mutationen für sich zu einem selektiven Wachstumsvorteil der betroffenen Zelle, was in der Folge zu Entstehung eines Adenoms und schließlich Karzinoms führen kann (Fearon und Vogelstein 1990; Arends 2000; Küster 2009).

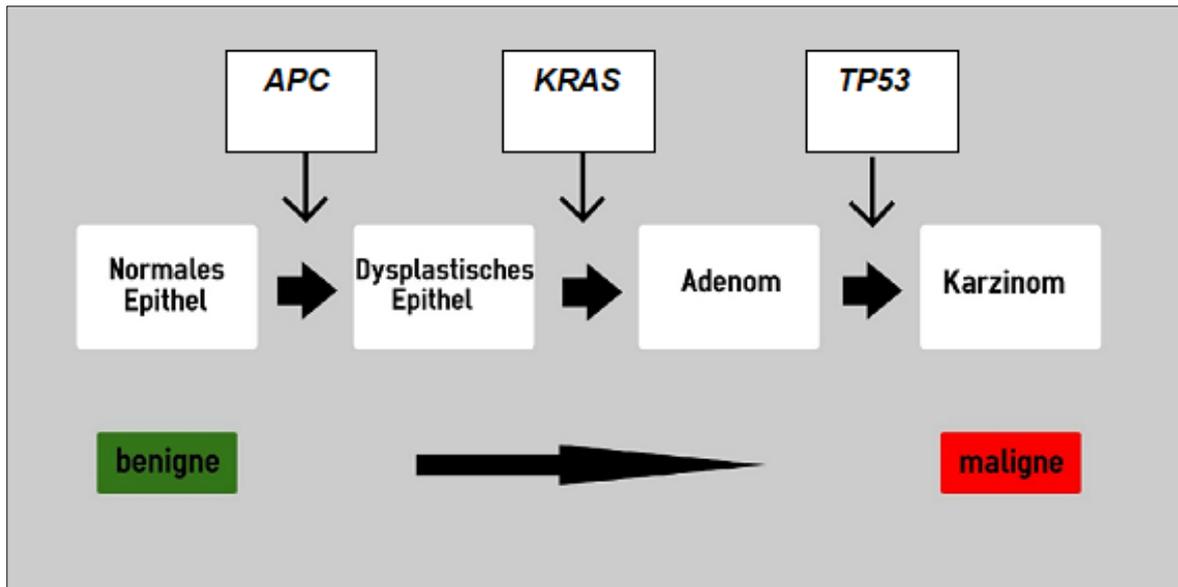


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Entwicklung des CRC modifiziert nach (Smith et al., 2002)

1.6.1 APC-Mutation

Eine inaktivierende Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) wird auch für die Entstehung der FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis), einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, bei der es bereits im jungen Erwachsenenalter zur Entwicklung multipler Darmpolypen mit erheblicher Entartungstendenz kommt, verantwortlich gemacht. Bei heterozygotem Funktionsverlust von *APC* im Rahmen der FAP ist jedoch ein „secondhit“, also der somatische Verlust des zweiten Allels zur Adenombildung erforderlich. Ein somatischer Funktionsverlust von *APC* findet sich aber auch in den meisten sporadisch auftretenden CRC (Powell et al. 1992; Kinzler und Vogelstein 1996; Rowan et al. 2000).

Das *APC*-Gen spielt eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg. Dieser ist insbesondere während der Embryogenese für verschiedene Differenzierungsprozesse, so beispielsweise für die Ausbildung der Organanlagen zuständig. Dieser Signalweg wird aber auch mit der Entstehung verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht (Ruhstroth, 2007). Eine zentrale Rolle innerhalb des Wnt-Signalwegs spielt das Protein β -Catenin, welches sowohl an Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist, als auch als Transkriptionsfaktor fungiert. Es bildet Komplexe mit mehreren anderen Proteinen und wird im Verlauf nach Phosphorylierung dem Abbau durch Proteasomen zugeführt. *APC* ist unerlässlich für diesen Vorgang (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Rasso, 2008).

Liegt *APC* in mutierter Form vor, ist die Phosphorylierung von β -Catenin nicht bzw. nur noch unzureichend möglich. Das unphosphorylierte und dadurch stabilisierte β -Catenin

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

akkumuliert im Zytoplasma. Auf diese Weise wird der Wnt-Signalweg unkontrolliert aktiviert und es resultiert eine Störung der Zelldifferenzierung (Ruhestroth, 2007).

1.6.2 KRAS-Mutation

1982 konnte als erstes Onkogen das *HRAS*-Gen in punktmutierter Form in menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Chang et al., 1982). *HRAS* gehört zur Gruppe der RAS Proteine, die nach einem Tumor der Ratte benannt wurden (Rat Sarcoma). Neben der Mutation von *APC* ist auch eine RAS-Mutation in mehr als einem Drittel aller CRC zu finden (Bos et al., 1987). RAS gehört, wie auch die Unterform KRAS zu den G-Proteinen und spielt eine zentrale Rolle in mehreren Signaltransduktionswegen und Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Ist das G-Protein an GTP (Guanosintriophosphat) gebunden, ist es aktiv, eine Bindung an GDP (Guanosindiphosphat) resultiert hingegen in einer Inaktivierung (Wittinghofer und Pai 1991; Rassow 2008). Die Überführung der inaktiven in die aktive Form wird von Austauschfaktoren der Gruppe GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factors) und von GAP (GTPase-bindenden Proteinen) katalysiert (Mitin et al. 2005; Bos et al. 2007; Tcherkezian und Lamarche-Vane 2007; Vigil et al. 2010; Wagener und Müller 2010). RAS ist in der aktiven Form über seine GTPase-Aktivität zu einem geringen Anteil selbst in der Lage GTP zu GDP zu hydrolysieren und sich dadurch selbst zu inaktivieren. Erheblich beschleunigt wird dieser Vorgang auch durch GAP (Wagener and Müller, 2010). Aktives GTP setzt verschiedene Proliferationsprozesse und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Gang. Mutationen von *KRAS* führen sowohl zur Hemmung der GAP und somit auch zum verminderten Abbau von GTP als auch zur Unterdrückung der GTPase-Aktivität von *KRAS* selbst. Folglich akkumuliert aktives GTP und kann hierdurch weitgehend ungehemmte Proliferationsprozesse in Gang setzen (Bos 1989; Schubbert et al. 2007; Tan und Du 2012).

1.6.3 TP53-Mutation

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Entstehung des CRC sind Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53*. *TP53* ist maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Es induziert bei Erkennen von Schäden der DNA den Zellzyklusarrest in der G1-Phase und erleichtert die Reparatur der DNA, bevor die Zelle repliziert wird bzw. führt zur Apoptose (Armaghany et al., 2012; Lane and Benchimol, 1990; Vogelstein et al., 1988). Eine Mutation des für P53 kodierenden Gens resultiert daher in einer nicht oder nur unzureichend stattfindenden Apoptose und die mit geschädigter Erbinformation ausgestattete Zelle wird

nicht eliminiert. Neben dem Verlust der Funktion als Tumorsuppressorprotein können Mutationen in *TP53* durch veränderte Proteinfaltung auch onkogene Funktionen entstehen lassen, die sowohl Proliferation als auch Invasivität der betroffenen Zellen steigern (Olive et al. 2004; Freed-Pastor and Prives 2012). Man bezeichnet diesen Vorgang deshalb auch als Gain-of-function-Mutation (Oren und Rotter 2010). Ein Beispiel für eine solche gain-of-function-Mutation ist die Hotspot-Mutation in Codon 175 *TP53* R175H. Das murine Pendant ist *Tp53* R172H (Olive et al. 2004), das auch im hier vorgestellten Modell verwendet wird.

1.7 Mausmodelle

Das menschliche Genom ist dem der Maus sehr ähnlich. Man geht davon aus, dass sich zu etwa 80% der Gene der Hausmaus (*Mus musculus*) ein einziges homologes Gen im menschlichen Genom finden lässt und weniger als 1% der Gene des Mausgenoms kein korrespondierendes Gen an irgendeiner Stelle im Erbgut des Menschen aufweisen (Waterston et al., 2002). Mäuse lassen sich relativ leicht züchten, die Unterhaltskosten sind gering und die Tiere haben eine kurze Tragezeit mit großen Würfen von etwa 6-12 Jungtiere pro Wurf (Zutphen et al., 1995). Diese Eigenschaften machen die Hausmaus zum am häufigsten eingesetzten Versuchstier in Tiermodellen in der Onkologie.

1.7.1 GEMM – Genetically engineered mouse model

Um ein möglichst realistisches und vielseitig einsetzbares Modell zu erlangen, müssen im Modellorganismus zuverlässig Tumoren erzeugt werden können, die in Größe, Lokalisation, Histologie und Molekularbiologie der humanen Erkrankung ähneln. Per Xenotransplantation etablierte Tumoren entstehen in immunsupprimierten Tieren auf Basis von meist hochgradig anaplastischen Zelllinien, was den Realismus solcher Modelle stark einschränkt (Dangles-Marie et al., 2007). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein bereits etabliertes Modell (Hung et al., 2010) mit genetisch veränderten Tieren weiter modifiziert. Hungs Modell beinhaltet ebenso wie das hier dargestellte Modell eine Mutation im *Apc*- und *Kras*-Gen. Es wurde zusätzlich noch ein konditionales Allel von *Tp53* eingekreuzt, da wie oben beschrieben auch Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms beitragen (Amtsfeld, 2017). Die *TP53*-Mutation tritt zumeist zum Zeitpunkt der Transition von einem Adenom in ein Karzinom auf (Armaghany et al., 2012).

1.7.2 Cre-LoxP-System

Die Voraussetzung für ein solches Modell ist ein Werkzeug, um die DNA *in vivo* zu manipulieren. Ein solches Werkzeug ist das Cre-LoxP-System, welches in den 1980er Jahren entwickelt wurde (Sternberg 1981; Sauer und Henderson 1988). Hierfür werden die entsprechenden Gensequenzen am Anfang und Ende mit einer 34 bp-großen Markierung versehen, die man lox-P (locus of crossing over, aus Bakteriophage P1) nennt (Feil et al., 2009). Diesen Vorgang bezeichnet man als *Floxed* („flanked by lox P“). Die auf diese Weise „gefloxten“ Basensequenzen können von einer speziellen DNA-Rekombinase, der Cre-Rekombinase erkannt und ausgeschnitten werden. Diese Rekombinase ist außerdem in der Lage, bei entgegengesetzter Orientierung der lox-P-Stellen die entsprechenden Abschnitte zu invertieren oder – wenn die gefloxten Abschnitte auf verschiedenen DNA-Molekülen liegen – eine Translokation der markierten Gene zu katalysieren (Feil et al., 2009; Metzger and Feil, 1999).

Verändert man die entsprechenden Zielgene in nicht-konditioneller Form schon auf Keimbahnebene, ohne eine zeitliche und örtliche Induktion zu ermöglichen, scheitern die Versuchsvorhaben oft bereits daran, dass die Embryonen durch einen ausgeprägten Phänotyp einer Mutation nicht überlebensfähig sind und sich dadurch einer genauen Prüfung des Stellenwertes und der Auswirkung der Mutation entziehen.

Es ist deshalb erforderlich, das Auftreten von Mutationen zeitlich und örtlich zu kontrollieren (konditionelle Mutationen). Konditionell veränderte Gene führen normalerweise vor Aktivierung nicht zu einem Phänotyp (Evans et al., 2016). Zeitliche Kontrolle erfährt der Vorgang dadurch, dass die Cre-Rekombinase erst zum gewünschten Zeitpunkt den Tieren zugeführt werden. Eine solche Möglichkeit stellt die Infektion der Zellen, in denen die konditionellen Genveränderungen aktiviert werden sollen, mit einem Cre-kodierenden Adenovirus dar.

Eine weitere Möglichkeit, Cre im Zielgewebe zu exprimieren um konditionelle Mutationen gewebespezifisch zu aktivieren, ist das Einbringen von Cre in die Keimbahn, jedoch unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Dies kann für den Darm z.B. durch den Villin-Promotor, der sowohl im Dick- als auch im Dünndarm exprimiert wird, geschehen. Ist diese Cre-Rekombinase dann noch tamoxifen-abhängig (Cre^{ERT2}), wird sie nur nach systemischer Gabe von Tamoxifen aktiv und kann somit auch zeitlich gesteuert werden.

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms hat insbesondere aufgrund seiner Häufigkeit hohen Stellenwert in der Forschung.

Im GEMM des CRC von Hung et al. wird die Karzinogenese wie oben beschrieben durch chirurgische Einbringung des Adeno-cre-Virus erreicht und dient in der vorliegenden Arbeit als Goldstandard. Die Arbeit mit Adenoviren erfordert jedoch hohe Sicherheitsstandards und birgt ein gewisses Infektionsrisiko für den Untersucher. Da Adenoviren potentiell jede Zelle der Maus infizieren können, ist außerdem keine Spezifität für das Kolon gegeben.

Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Karzinogenese im Modell auch durch die Einkreuzung eines darmspezifischen, Tamoxifen-induzierbaren Cre-Allels (Vil-Cre^{ERT2}) und Einbringung des selektiven Estrogenrezeptormodulators Tamoxifen erreicht werden kann.

Hierfür benötigt man eine Mauslinie, die sowohl die konditionellen Genveränderungen enthält, als auch die tamoxifenabhängige Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des gewebespezifischen Promotors Villin exprimiert, sodass die Genveränderung nur in Villin-positiven Zellen aktiv wird. Villin ist ein Protein, das zunächst aus dem intestinalen Bürstensaum des Huhns isoliert werden konnte (Bretscher and Weber, 1979). Es trägt zur Stabilisierung des Zytoskeletts der Mikrovilli bei. Jene Mikrovilli sind u.a. Bestandteil des Bürstensaums des Dün- und Dickdarms (Dudouet et al., 1987). Zur Kontrolle des Cre/lox-Systems wurde die Cre-Rekombinase im Zytoplasma über eine Ligandenbindungsdomäne an einen Estrogenrezeptor (ER) gebunden (Cre^{ERT2}) (Feil et al., 1996, 1997; Metzger et al., 1995; Zhang et al., 1996). Die Rekombinase ist im so gebundenen Zustand nicht in der Lage, in den Nucleus zu gelangen und dort selektive Doppelstrangbrüche hervorzurufen. Nach Bindung von Tamoxifen beziehungsweise dessen Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) kann Cre^{ERT2} in den Nucleus gelangen und dort die Rekombination auslösen (Feil et al., 2009). Zur Verringerung der Affinität von ERT2 an endogene Östrogene der Maus wurden Punktmutationen in den Ligandenbindungsdomänen eingeführt, die in einer Östrogen-Insensitivität und Tamoxifen-Sensitivität resultieren (Feil et al., 1997). Hieraus ergibt sich, dass die Cre-Rekombinase nur durch Tamoxifen bzw. OHT aktiviert wird und eine Störung des Systems durch körpereigene Hormone nahezu ausgeschlossen wird.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

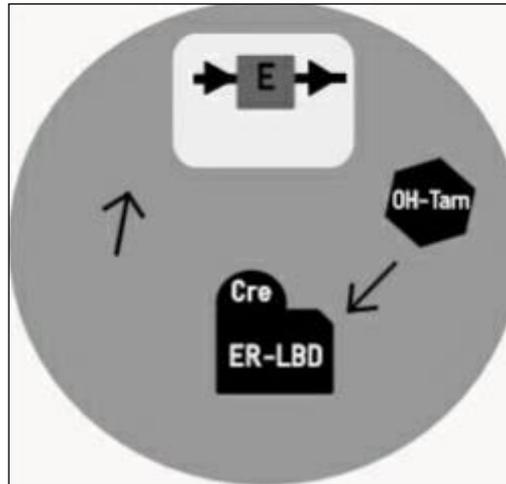


Abbildung 2: Schema des Cre^{ERT2}-Prinzips: Im Zellkern befinden sich die geflochten (Dreiecke) Gene/ Exons (weiße rechteckige Box mit Darstellung eines geflochten Exons), im Zytoplasma befindlicher Estrogenrezeptor mit Cre und Ligandenbindungsdomäne (ER-LBD), bindet OH-Tam. Modifiziert nach (Feil et al., 1996,1997)

Zur Kontrolle der Cre-Rekombination wurden Reportermauslinien entwickelt. Die bekannteste Linie ist der sogenannte R26-lacZ Maus, die Cre-vermittelt β -Galactosidase exprimiert (Soriano, 1999), die einfach und spezifisch angefärbt werden kann. Wir verwenden diese Reportermaus ebenfalls für unsere Experimente.

Es soll so zunächst die nach rektaler Applikation am besten wirksamste Tamoxifenkonzentration ermittelt werden. Die von uns verwendeten Reportertiere enthalten das β -Galaktosidase-Reporterallel sowie Vil-Cre^{ERT2}. β -Galaktosidase ist ein Enzym, welches β -Galaktoside und damit u.a. auch den Stoff x-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid) hydrolisiert. Die Spaltung von x-gal und die Reaktion eines der Spaltprodukte mit Sauerstoff resultiert dann nach entsprechender x-gal Färbung in einer dunkelblauen Ausfällung (Horwitz et al., 1964; Kiernan, 2007). Die Tiere zeigen somit blaue Färbungen in β -Galaktosidase-positiven Zellen, im hier beschriebenen Reportermodell in Zellen, die VilCre^{ERT2}-positiv sind und einer ausreichenden Konzentration Tamoxifen ausgesetzt waren. So soll die Tamoxifen-Dosis ermittelt werden, die nach rektaler Instillation vereinzelt Rekombinationen im Colon, jedoch keine im Ileum entwickeln. Es sollen nur vereinzelt Rekombinationen erreicht werden, da davon auszugehen ist, dass zu viele Rekombinationen in den tumorbildenden Tieren in vielen Kolonkarzinomen resultieren oder aber sich eine Karzinombildung auch im Dünndarm zeigt. Tiere mit konditionellen, onkogenen Mutationen, die mit dieser entsprechenden Dosierung behandelt werden, sollten demnach vereinzelt Kolonkarzinome entwickeln.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Anschließend soll die in Reporter-mäusen ermittelte Dosierung an den tumorbildenden Tieren (AKP-Mäuse) angewandt und die Reaktion zunächst postoperativ durch wöchentliche Koloskopie (insgesamt acht Wochen) und dann ebenso im histologischen Präparat geprüft werden. Auch die tumorbildenden Tiere exprimieren durch das VillCre^{ERT2}-Allel die Cre-Rekombinase nur unter Kontrolle des darmspezifischen Promoters Villin. Es soll gezeigt werden, dass die lokale Tumorinduktion bei den tumorbildenden Tieren durch Tamoxifen möglich ist, ohne darüber hinaus im Dünndarm Tumoren zu verursachen.

Die Zielstellung dieser Arbeit ist also, ein bestehendes Mausmodell sicherer und praktikabler zu gestalten. Hierfür soll ein neues Tumorinduktionsmedium eingeführt werden. Die am besten wirksamste Konzentration des neuen Induktionsmediums Tamoxifen soll an einer Reportermauslinie ermittelt werden. Im Anschluss soll diese Konzentration dann an den eigentlichen tumorbildenden Tieren angewandt werden und die Umstellung erfolgen. Die einfachere und trotzdem spezifische Induktion der Tumoren würde eine entscheidende Verbesserung des Modells bedeuten und damit zur Grundlagenforschung beim CRC beitragen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

3. MATERIALIEN, TIERMODELL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Bezeichnung, Ort, Land
Digitalkamera Mikroskopsystem	Leica Biosystems, DMI 3000 B, Wetzlar, DE
Endoskopkamera	Karl Storz Endoskope, SCB image 1 hub, Tuttlingen, DE
Instrumentenset	Aesculap, Tuttlingen, DE
Kühlplatte	Medite Technik, COP 30, Burgdorf, DE
Lichtquelle	Karl Storz Endoskope, SCB Xenon 175, Tuttlingen, DE
Narkosegerät	Parkland Scientific, Table Top Anesthesia System, Coral Springs, Florida, USA
Optik Hopkins 2,7 mm	Karl Storz Endoskope, 67208 BA, Tuttlingen, DE
Paraffinausgußstation	Leica Biosystems, EG 1150 H, Wetzlar, DE
Paraffin Streckbad	Medite Technik, TFB 35, Burgdorf, DE
Rotationsmikrotom	Leica Biosystems, RM 2265, Wetzlar, DE
Wärmematte	Labotect, Hotplate 062, Rosdorf, DE

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Bezeichnung, Ort, Land
2 ml Tubes	Eppendorf, 0030120094, Hamburg, DE
Chirurgische Hautklammern	World Precision Instruments, Reflex Wound Clips (7mm), Sarasota, FL, USA

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Deckgläser Histologie	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Deckgläser 24x50 mm, Edermünde, DE
Einmalspritzen mit Injektionsnadel, 1 ml	BD Medical, Micro Fine 0,3ml, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Einbettkassetten	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Biopsieeinbettkassetten mit Deckel, Wien, Österreich
Mikrotommesser	Leica Biosystems, Leica 819 Microtome Blades Low Profile, Wetzlar, DE
Nahtmaterial	Ethicon, PDS II 6-0, Norderstedt, DE
Objekträger	Thermo Scientific, Menzel Gläser Superfrost Ultra Plus, Braunschweig, DE
Teflonschlauch	Smith Medical GmbH, Nylon Schlauch, finebore tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mm OD, Grassbrunn, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller, Bezeichnung, Ort, Land
Aqua dest.	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Aqua nondest.	Leitungswasser, Stadtwasser Dresden
Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Bepanthen Augensalbe, Leverkusen, DE
Buprenorphin	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Butanol	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Eosinlösung	Sav liquid production, Eosinlösung 1%, Flintsbach am Inn, DE
Ethanol, 70%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Ethanol, 96%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Ethanol, 100%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Formaldehyd 1%	Sav liquid production, Formaldehydlösung 1%, Flintsbach am Inn, DE
Gluteraldehyd 0,2%	Sav liquid production, Gluteraldehydlösung 0,2% Flintsbach am Inn, DE
Hämatoxylinlösung	Sav liquid production, Hämatoxylinlösung Flintsbach am Inn, DE
Isopropanol	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Kaliumferricyanid, $K_3Fe(CN)_6$	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Kaliumferrocyanid, $K_4Fe(CN)_6$	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Natriumdesoxycholat, 0,1%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Natriumchlorid 0,9%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
Nonylphenoethoxylat, NP-40, 0,02%	Klinikapotheke, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, DE
PBS-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Gibco Phosphate-Buffered Saline, Waltham, Massachusetts, USA
Paraffin	Leica Biosystems, Paraplast Standard, Wetzlar, DE
Sonnenblumenöl als Trägersubstanz	Lidl Vita D'or, Sonnenblumenöl, Neckarsulm, DE
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, 0,25% in EDTA, Braunschweig, DE

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

X-gal	Thermo Fisher Scientific, X-gal, Braunschweig, DE
-------	---

3.1.4 Reagenzien zur Tumorinduktion

Tabelle 4: Reagenzien zur Tumorinduktion

Reagenzien zur Tumorinduktion	Hersteller, Bezeichnung, Ort, Land
Adenovirus Ad5CMVCre	Gene Transfer Vector Core, University of Iowa, USA
5-Hydroxytamoxifen (5-OH-Tam)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

3.1.5 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Verwendung	Name	Hersteller, Ort, Land
Digitale Fotodokumentation am Mikroskop	Leica Application Suite V3	Leica Biosystems, Wetzlar, DE
Statistische Auswertung	Graphpad Prism 7	GraphPad Software Incorporation, La Jolla, California, USA
Verwaltung der Mauskolonie	PyRAT	Scionics Computer Innovation, Dresden, DE

3.2 Tiermodell

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Hausmäuse (*Mus musculus*) ab einem Alter von acht Wochen in den Versuch eingeschlossen. Um altersspezifische Effekte auszuschließen, wurden nur Tiere im Alter zwischen acht und achtzehn Wochen für das Experiment genutzt.

Eingesetzt wurden drei Gruppen von Tieren. Die erste Gruppe war die Gruppe der tumorbildenden Tiere, die mit dem Adenovirus behandelt wurde (Goldstandard). Eine zweite Gruppe stellten die Reportertiere dar, die nach Applikation von Tamoxifen als Zeichen der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Rekombination blaue Verfärbungen im Darm entwickelten. Die tumorbildenden Tiere, die nach Applikation von Tamoxifen Tumoren entwickelten, bildeten die dritte Gruppe.

Von allen drei Gruppen wurden auch Tiere jeweils ohne Virus bzw. Tamoxifen behandelt. Diese Tiere wurden mittels gleicher Operation und sonstiger Methodik behandelt, jedoch erhielten sie Tamoxifen-freies Speiseöl (Vehikel) in den Darm appliziert (Tab.6).

Es wurden verschiedene Konzentrationen von Tamoxifen eingesetzt, um die Konzentration zu ermitteln, bei der vereinzelt Rekombinationen im Kolon stattfinden, jedoch keine im restlichen Intestinum. Je Konzentration wurden zunächst drei Tiere verwendet. Die beiden Konzentrationen, die in der Histologie die besten Ergebnisse erbrachten, wurden an nochmals je drei Tieren verwendet. Die Tiere, die das Virus appliziert bekamen, erhielten jeweils die gleiche Konzentration, nämlich 1×10^{12} pfu des Adenovirus.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Tiere

Bezeichnung der Maus	Behandlung	Anzahl der Tiere
Tumorbildende Maus (ohne VillinCre ^{ERT2})	Vehikel (NaCl)	6
Tumorbildende Maus (ohne VillinCre ^{ERT2})	Adenovirus (in NaCl 0.9%)	6
Reportermaus (mit VillinCre ^{ERT2})	Vehikel (Speiseöl)	3
Reportermaus (mit VillinCre ^{ERT2})	Tamoxifen (in Speiseöl)	15
Tumorbildende Maus (mit VillinCre ^{ERT2})	Vehikel (Speiseöl)	6
Tumorbildende Maus (mit VillinCre ^{ERT2})	Tamoxifen (in Speiseöl)	28

Die experimentellen Arbeiten wurden an einem Mausmodell mit genveränderten Tieren durchgeführt. Ein Modell ähnlicher Art existierte bereits (Hung et al. 2010). Dieses Modell (mit Mutationen in *Apc* und *Kras*) ist für unser Projekt durch Einkreuzen eines konditionalen Allels des Tumorsuppressorgens *Tp53* ergänzt worden.

Die Tiere für die Virusapplikation hatten ebenfalls diesen genetischen Hintergrund. Hier wurde kein VillinCre^{ERT2} eingekreuzt, da diese Tiere die Cre-Rekombinase durch Applikation des AdenoCre-Virus erhielten.

Genetischer Hintergrund aller im hier vorliegenden Versuch verwendeten Tiere ist C57/Bl6N.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Verwendete Allele:

- VillinCre^{ERT2}: Induzierbares Cre wird unter der Kontrolle des darmspezifischen Promotors *Villin* exprimiert
- R26-LacZ: Nach Cre-Rekombination exprimieren diese Tiere in den rekombinierten Zellen β -Galaktosidase. β -Galaktosidase kann im Gewebe sehr gut angefärbt werden, weshalb Tiere dieser Linie als Cre-Reportertiere dienen.
- LSL.Kras G12D: Es handelt sich hierbei um ein konditionelles Allel (LSL = lox-stop-lox) der onkogenen *Kras*-Mutation G12D. Vor Cre-Rekombination ist dies eine funktionelle Nullmutation, nach Rekombination wird das onkogene Protein exprimiert.
- LSL.Tp53 R172H: Es handelt sich hierbei um ein konditionelles Allel der onkogenen *Tp53*-Mutation R172H (entspricht der häufigsten humanen Hotspot-Mutation *TP53* R175H). Vor Cre-Rekombination ist dies eine Nullmutation, nach Rekombination wird das onkogene Protein exprimiert.
- APC CKO: Es handelt sich hierbei um ein konditionelles Knockout-Allel von *Apc*. Das *Apc*-Knockout wird durch Cre-Rekombination erreicht.

Folgende Genotypen wurden verwendet:

- APC CKO; LSL.Kras G12D; LSL.Tp53 R172H: Tiere für die Virusapplikation
- VillinCre^{ERT2}; R26-LacZ: Tiere zum Rekombinationsnachweis durch β -Galaktosidase (im Folgenden Reportertiere)
- VillinCre^{ERT2}; APC CKO; LSL.Kras G12D; LSL.Tp53 R172H: Tiere, die nach Tamoxifengabe Tumoren entwickeln (im Folgenden tumorbildende Tiere)

3.3 Methoden

3.3.1 Literaturrecherche

Im Zeitraum April 2015 bis Dezember 2018 wurde in der medizinischen Datenbank PubMed eine elektronische Suche mit der Zielsetzung durchgeführt, Publikationen bezüglich aktueller Tiermodellmethodik zum kolorektalen Karzinom und der Therapie des kolorektalen Karzinoms zu finden. Die Datenbanken wurden auf das Vorkommen folgender Schlüsselworte an einer beliebigen Stelle im Text durchsucht: Darmkrebs (colorectal cancer), kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma), orthotopes Mausmodell (orthotopic mouse model), Tamoxifen (tamoxifen), induzierbares CRE (inducible CRE), genetisch verändert (genetically engineered), Karzinogenese (carcinogenesis), KRAS, APC, TP53, xgal staining, Adenom-Karzinom-Sequenz (adenoma carcinoma sequence)

3.3.2 Operationsmethode

Die Tiere wurden nach Narkose mittels Isofluran-Inhalation (1,5-2,5 Vol%) und Analgesie mit Buprenorphin (0,05 mg/kg in 100µL Volumen s.c.) mit Augensalbe versorgt und in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert.

Vor dem Hautschnitt und zur Überwachung der Narkosetiefe erfolgte die Überprüfung der Vollnarkose durch Prüfen des Ausfalls des Zwischenzehenreflexes (Ausfall der Reaktion auf typische externe Stimuli).

Anschließend wurde eine mediane Unterbauchlaparotomie (ca. 1 cm) durchgeführt, das distale Kolon aufgesucht und mittels weicher Darmklemme etwa 3 cm proximal der Linea dentata abgeklemmt. Danach wurde ein flexibler Teflonschlauch behutsam von transanal eingebracht und das distale Kolon mit NaCl 0,9% gespült, um Kotreste aus dem auszuklemmenden Darmabschnitt zu entfernen. Dann erfolgte das vollständige Ausklemmen des Darmsegments durch Setzen einer weiteren weichen Darmklemme etwa 3mm aboral der ersten Klemme unter Einbezug des Endes des Teflonschlauches. Dann Instillation von 100µl Trypsinlösung (0,25% in EDTA) in das ausgeklemmte Segment. Das Trypsin führt durch Proteolyse zum Aufbrechen der Schleimbarriere und partieller Aufhebung der Kryptenstruktur, um die zu infizierenden *Lgr5*-positiven Stammzellen an der Kryptenbasis freizulegen. Bei den mit Tamoxifen behandelten Tieren entfiel aufgrund der Lipophilie und damit guten Gewebegängigkeit von Tamoxifen diese Maßnahme. 10 min Einwirkzeit der Trypsinlösung. Anschließend Ablassender Trypsinlösung und nochmalige Spülung mit NaCl 0,9% sowie erneutes Setzen der distalen Klemme. Es erfolgte die Instillation der Viruslösung (1 x 10¹¹pfu in 100µl NaCl 0,9%, 30 min Einwirkzeit) bzw. von

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Tamoxifenlösung (Konzentrationen s.u., 5 min Einwirkzeit). Danach wurden beide Klemmen und der Teflonschlauch entfernt. Spülung des Abdomens mittels NaCl 0,9% sowie sorgfältige Kontrolle auf Unversehrtheit der Bauchhöhle und Bluttrockenheit. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte mittels PDS II 6-0 fortlaufend, die Haut wurde mit chirurgischen Hautklammern verschlossen. Aufwachphase auf der Wärmematte, anschließend wurden die Tiere wieder in ihre Käfige überführt.

Die Operation wurde bei allen Versuchsgruppen auf gleiche Weise durchgeführt.

Im Anschluss an die durch chirurgisches Einbringen des entsprechenden Wirkmediums (Adenovirus oder Tamoxifen) erfolgte Tumorinduktion wurden alle Tiere täglich begutachtet, um mögliche Komplikationen frühzeitig zu entdecken. Die β Gal-Reportertiere wurden nach zwei Wochen getötet und der Dünn- und Dickdarm histologisch mittels Xgal-Färbung auf Rekombinationsereignisse untersucht, während die tumorbildenden Tiere bis acht Wochen postoperativ wöchentlich koloskopiert wurden, um Anzahl und Größe der entstehenden Tumoren zu kontrollieren. Im Anschluss wurden auch die tumorbildenden Tiere getötet, Dünn- und Dickdarm entnommen, histologisch aufbereitet und untersucht.



Abbildung 3: Darstellung des Operationssitus einer Maus unter Analgesie, Narkose und Wärmelagerung

Pfeil 1: Ausgeklemmtes Dickdarmsegment;

Pfeil 2: Teflonschlauch über den Anus eingeführt, Ende des Schlauchs im ausgeklemmten Dickdarmsegment liegend

3.3.3 Koloskopie der tumorbildenden Mäuse

Die Tiere wurden in Isoflurannarkose in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert. Die Koloskopie wurde mit einem starren Tierendoskop der Firma Storz (Coloview System Mainz, 2,7 mm Außendurchmesser der Optik) mit minimaler Insufflation von Raumluft in das Kolon durchgeführt. Koloskopisch konnten die distalen 3-4 cm des Kolons auf Vorkommen, Anzahl von Tumoren und deren makroskopische Beschaffenheit untersucht werden. Die Schleimhautveränderungen wurden fotodokumentiert. Nach der Untersuchung erfolgte die Aufwachphase auf einer Wärmematte, dann wurden die Tiere wieder in ihre Käfige überführt und überwacht.

3.3.4 Überwachung, Töten und Organgewinnung

Alle Tiere wurden täglich begutachtet. Beurteilt wurden Fress- und Sozialverhalten, Selbstpflege und Bewegungsabläufe. Auch das Gewicht wurde kontrolliert. Postoperativ erfolgte die Kontrolle über zwei Stunden kontinuierlich und nochmals am Abend des OP-Tages. Am ersten und zweiten postoperativen Tag fand zweimal täglich eine Kontrolle statt, danach täglich. Jederzeit waren alle Tiere mit ausreichend frischem Wasser und Nahrung ad libitum versorgt. Die Analgesie von erkennbaren Schmerzen erfolgte mittels subkutaner Buprenorphinjektion (0,05mg/kg KG), Tiere mit starken oder therapierefraktären Schmerzen (Bewegungs- und Kontaktlosigkeit, Zittern, Gewichtsabnahme) und/oder fortgeschrittenem Tumorleiden wurden umgehend schonend getötet. Alle Tiere wurden nach Betäubung durch O₂/CO₂ Gasgemisch mittels zervikaler Dislokation spätestens nach Versuchsbeendigung getötet und nach Entnahme des Dün- und Dickdarms vorschriftsmäßig der Entsorgung zugeführt.

Nach der Euthanasie erfolgte die Entnahme von Dün- und Dickdarm. Hierzu wurden die Mäuse sorgfältig präpariert und der Darm gründlich mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Dabei wurden Kotreste entfernt, die beim Mikroskopieren stören würden. Alle Proben wurden aufgerollt als „swissroll“ in die Einbettkassetten gelegt.

3.3.5 Histologische Aufarbeitung der Organe der Reportertiere mittels Xgal Färbung

Alle Arbeiten, die Einbettung, Schneiden, Entwässern und Färben betreffen, wurden im Histologie-Labor des Forschungslabors der Klinik für Viszeral- Thorax- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden durchgeführt.

Während der Xgal Färbung erfolgte die Hydrolyse und Oxidation eines Substrats der β -Galaktosidase, welches daraufhin ein Indigoblauderivat bildete und dementsprechend im Darm sichtbar gemacht werden konnte. Die Entnahme der Organe und Vorbereitung erfolgte analog zur Vorgehensweise bei den Organen der tumorbildenden Tiere.

Nachdem die Proben in die Einbettkassetten überführt wurden, wurden die Darmanteile für 120 Minuten bei 4° C in folgender frisch angesetzter Lösung fixiert:

- Formaldehyd, 4%
- Glutaraldehyd, 25%
- NP-40, 100% (Nonylphenoethoxylat)
- PBS

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Für 100 ml des Fixativs wurden 25 ml Formaldehyd (4%ig), 800 µl Glutaraldehyd (25%ig), 20µl NP-40 (100%ig) und 74,18 ml PBS angesetzt.

Nach zwei Stunden Fixierungszeit wurden die Proben zweimal je 15 Minuten in PBS gewaschen.

Anschließend gelangten die Proben über Nacht bei Raumtemperatur in die Färbelösung aus:

- $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM
- $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 5 mM
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mM
- NP-40, 0,02%
- Natriumdesoxycholat, 0,1%
- X-Gal, 1mg/ml
- PBS

Für 100 ml der Färbelösung wurden 2500 µl $K_3Fe(CN)_6$, 2500µl $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 200 µl $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 200 µl NP-40, 2 ml Nadeoxycholat, 5 ml X-Gal und 87,6 ml PBS angesetzt.

Am nächsten Tag wurden die Proben der Färbelösung entnommen und wiederum zweimal je 15 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Darmanteile über Nacht in 4%igem Formaldehyd bei 4° C aufbewahrt und am Folgetag wiederum 15 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Gewebeerwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe.

Tabelle 7: Aufsteigende Alkoholreihe zur Gewebeerwässerung

Dauer	Reagenz
120 min	Ethanol 70%
120 min	Ethanol 96%
120 min	Ethanol 100%
120 min	Butanol

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Da X-Gal nicht Xylol-beständig ist, wurde bei den Präparaten der Reportertiere in der Entwässerungsreihe und auch später bei der HE Färbung Xylol durch Butanol ersetzt.

3.3.6 Einbettung, Schneiden und Färben der Reportertierpräparate

Die Einbettung der Proben in Paraffin erfolgte am Gerät Leica EG 1150 H. Die Proben wurden über Nacht im Paraffin zunächst bei 60°C gelagert. Nach erfolgter Einbettung wurden die Proben dann über Nacht bei -18°C gekühlt und härteten dabei vollständig aus.

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte am Rotationsmikrotom Leica RM 2265. Die Präparate wurden auf eine Dicke von 3 µm geschnitten. Um nicht bei jedem Präparat nur eine Ebene im Gewebe abzubilden, wurde zwischen den Schnitten auf ausreichendes Trimmen geachtet. Die Schnitte wurden zum Strecken ins Wasserbad übertragen und von hier auf Objektträger aufgebracht. Über Nacht wurden die Schnitte bei 40°C gelagert und auf diese Weise getrocknet.

Die Organe der Reportertiere wurden nach Xgal Färbung und Einbetten noch mittels HE Färbung gegengefärbt. Die HE Färbung erfolgte nach dem laboreigenen Protokoll (bei den Reportertieren wird Xylol durch Butanol ersetzt).

Tabelle 8: HE Färbung der mit Xgal gefärbten Präparate

Zeit	Reagenz
2 x 5 min	Butanol
2 x 3 min	Isopropanol
3 min	Ethanol 96%
3 min	Ethanol 80%
3 min	Ethanol 70%
3 min	Ethanol 50%
3 min	Aqua dest.
2 min	Hämatoxylin (Kernfärbung)
10 min	Aqua nondest. Spülen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

2 min	Eosin (Gegenfärbung von Proteinen, Bindegewebe, Fasern und Keratin)
5 min	Aqua nondest. Spülen
1 min	Ethanol 80%
2 x 2 min	Ethanol 96%
2 min	Isopropanol
2 x 5 min	Butanol

Nach dem Färben wurden die Präparate eingedeckt und dann mittels Mikroskop analysiert.

3.3.7 Histologische Aufarbeitung der Organe der Tumortiere

Die histologische Aufarbeitung der Proben der tumorbildenden Tiere erfolgte analog zur Verarbeitung bei den Reportertieren. Das Fixieren der Präparate nach dem Spülen und Entfernen der Kotreste erfolgte in Formaldehyd 4%. Auf die Xgal Färbung wurde verzichtet. Nach dem Einbetten in Paraffin fand die HE Färbung nach dem folgenden Standardprotokoll statt.

Tabelle 9: HE Färbung der Tumortierorgane

Zeit	Reagenz
2 x 5 min	Xylol
2 x 3 min	Isopropanol
3 min	Ethanol 96%
3 min	Ethanol 80%
3 min	Ethanol 70%
3 min	Ethanol 50%
3 min	Aqua dest.
3 min	Hämatoxylin (Kernfärbung)

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

10 min	Aqua nondest. Spülen
4 min	Eosin (Gegenfärbung von Proteinen, Bindegewebe, Fasern und Keratin)
5 min	Aqua nondest. Spülen
1 min	Ethanol 80%
2 x 2 min	Ethanol 96%
2 min	Isopropanol
2 x 5 min	Xylol

Nachfolgend wurden auch diese Präparate eingedeckt und mittels Mikroskop untersucht.

3.3.8 Statistisch-biometrische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte zunächst durch Berechnung der arithmetischen Mittel der jeweilig angewandten Konzentration von Tamoxifen. Hieraus wurden Varianz, Standardabweichung und Standardfehler für jede Konzentration nach folgender Formel berechnet. Die Auswertung erfolge mit Microsoft Excel (Version 2013) und GraphpadPrism 7. Aufgrund des deskriptiven Charakters wurde keine statistische Analyse im Sinne einer Signifikanztestung durchgeführt.

Arithmetisches Mittel:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Varianz:
$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{s^2}$$

Standardfehler:
$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Der jeweilige Streubereich einer Konzentration ergab sich durch Addition bzw. Subtraktion des Standardfehlers vom jeweiligen arithmetischen Mittel.

4. ERGEBNISSE

4.1 Allgemeines zur Datengewinnung

Der Tierversuch erstreckte sich insgesamt auf den Zeitraum Oktober 2013 bis März 2016. Die Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte im Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TUD.

4.2 Goldstandard Modell - Adenovirustiere

Die Experimente zur Prüfung der Umsetzbarkeit der Tumorinduktion durch Tamoxifen stützten sich auf das bereits etablierte Modell der Tumorinduktion durch ein Adenovirus (Hung et al., 2010). Es existieren keine genauen Vordaten zur Effizienz dieser adenoviralen Tumorinduktion und zum Auftreten von Tumoren im Dünndarm bei derart behandelten Tieren. Daher wurden zunächst 6 Tiere nach dem Goldstandard mit dem Adenovirus behandelt, in einem achtwöchigen Kontrollzeitraum wöchentlich koloskopiert und anschließend deren Dünndarm und Kolon zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

Es zeigte sich wie erwartet, dass durch das Cre-Adenovirus zuverlässig singuläre Tumoren erzeugt werden können. Allen Tieren der Goldstandardgruppe wurde nach Trypsinapplikation 1×10^{11} pfu Adenovirus in das distale Kolon appliziert, welches 30 Minuten einwirkte. Von 6 mit dem Virus behandelten Tieren entwickelten 6 (100 %) im Mittel nach 3,4 Wochen einen Tumor in dem mittels Koloskopie einsehbaren Bereich des Kolon. Jedes mit dem Adenovirus behandelte Tier hatte koloskopisch einen singulären Tumor im distalen Kolon, einige dieser Tumoren füllten das Darmlumen histologisch nahezu vollständig aus (Abb. 4). Koloskopisch ließ sich dieser Aspekt nur teilweise darstellen (Abb. 5).

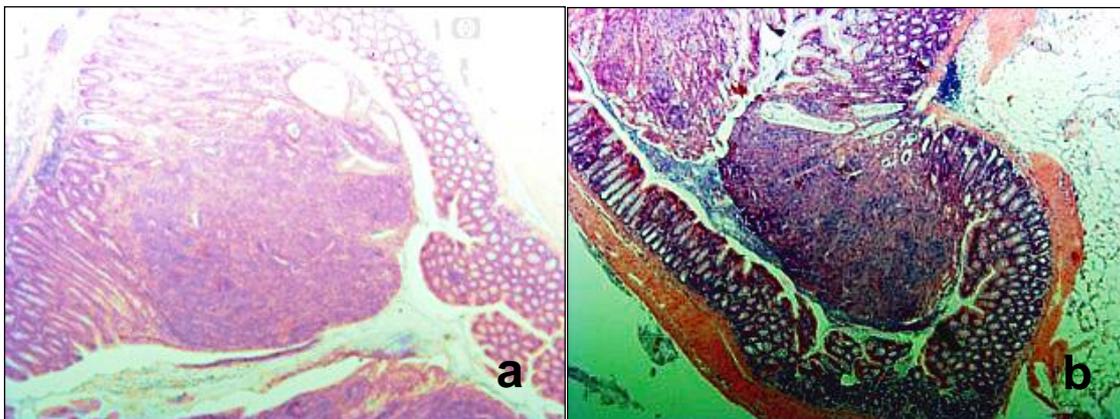
Nach histologischer Aufarbeitung zeigten sich bei diesen Tieren erwartungsgemäß keine Tumoren im Dünndarm (Tab. 10).

Zum Ausschluss einer Tumorentstehung durch andere Faktoren als das Adenovirus (z.B. operativer Stress, Trypsin) wurden auch Tiere operiert, die keine Viruslösung appliziert bekamen. Bei diesen Tieren verwendeten wir Natriumchloridlösung als Applikationsmedium. Es wurden sowohl Tiere im Alter von 13,9 Wochen, als auch im Alter von 27,1 Wochen verwendet. Die älteren Tiere (27,1 Wochen) wurden ohne vorherige Operation getötet und deren Kolon und Dünndarm histologisch aufgearbeitet und untersucht. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass das Alter der Tiere bei den mit dem Virus behandelten Tieren keinen Einfluss auf die Tumorentstehung hat.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Tabelle 10: Übersicht der mit dem Adenovirus behandelten Tiere (Tm SI: Tumoren im Dünndarm, Tm LI: Tumoren im Dickdarm, SEM Standardfehler, CI: Konfidenzintervall)

Tier (Ihd. Nr.)	Altersdurchschnitt in Wochen	Konzentration Adenovirus	Tm SI	Mittelwert +/- CI Tm SI	Tm LI	Mittelwert +/- CI Tm LI	SEM Tm LI	SEM Tm LI
V01	13,9	0	0	0	0	0	0	0
V02		0	0	CI	0	CI		
V03		0	0	0,00-0,00	0	0,00-0,00		
V04	27,1	0	0	0	0	0	0	0
V05		0	0	CI	0	CI		
V06		0	0	0,00-0,00	0	0,00-0,00		
V1	14,1	10 ¹² pfu	0	0 CI 0,00-0,00	1	1 CI 1,00-1,00	0	0
V2		10 ¹² pfu	0		1			
V3		10 ¹² pfu	0		1			
V4		10 ¹² pfu	0		1			
V5		10 ¹² pfu	0		1			
V6		10 ¹² pfu	0		1			



4a/b: Darstellung von Tumoren, die das Darmlumen nahezu vollständig ausfüllen, jeweils 12 fach vergrößert

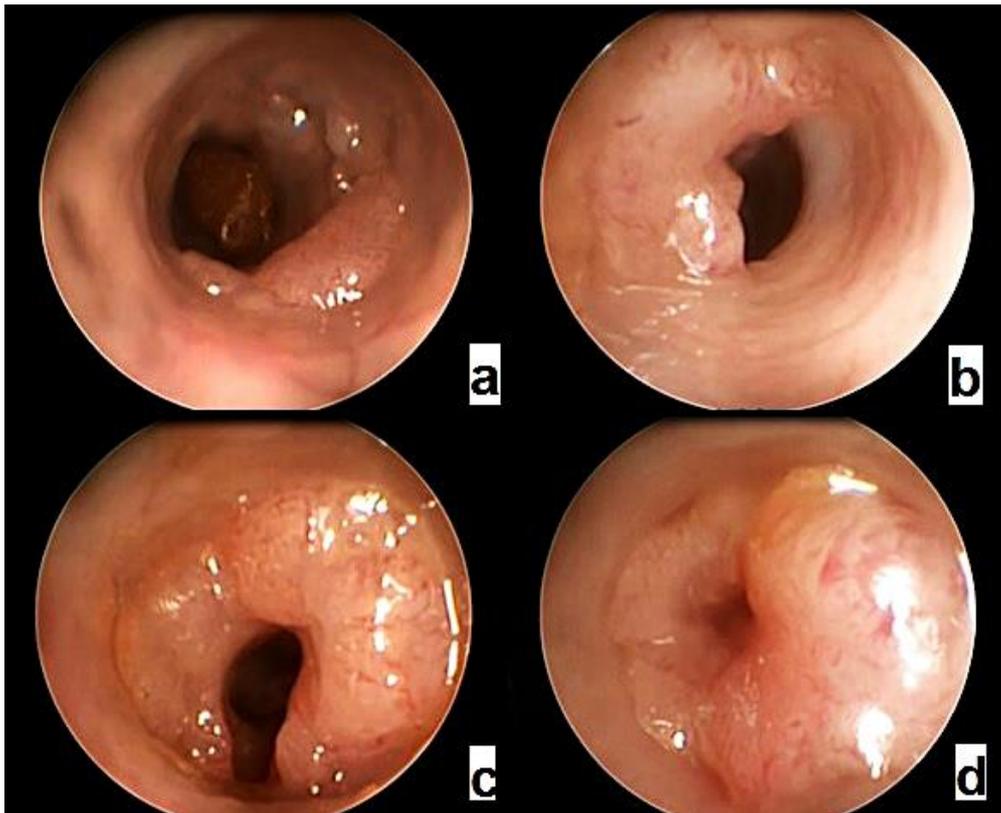


Abbildung 5: Koloskopische Bilder der Tumoren der Virustiere

5a + b Frühe Tumoren im distalen Kolon

5c + d Das Lumen zum Teil einengende Tumoren im distalen Kolon

4.3 Dosisermittlung Tamoxifen - Reportertiere

Im Rahmen der Umstellung der Tumorinduktion auf Tamoxifen war es zunächst notwendig, die wahrscheinlich wirksame Tamoxifen-Konzentration, mit der die lokale Behandlung erfolgen sollte, zu ermitteln. Die angestrebte Konzentration sollte möglichst keine Rekombinationen im Dünndarm und möglichst wenige Rekombinationen (jedoch mindestens eine, um einen Tumor zu induzieren) lokal im Kolon hervorrufen. Hierzu behandelten wir Reportertiere mit verschiedenen Konzentrationen der Tamoxifenlösung nach o.g. Protokoll. Nach 14 Tagen wurden die so behandelten Tiere getötet, Kolon und Dünndarm entnommen, mit einer XGal-Färbung gefärbt und die Rekombinationen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Ausgangskonzentration von 100 μM bewirkte kaum Rekombinationen. Die zehnfache Konzentration (1000 μM) ergab deutlich zu viele Rekombinationen im Dünndarm (6,3 +/- 0,47) und Dickdarm (6,67 +/- 1,45). Auch bei einer applizierten Konzentration von 250 μM fanden sich im Mittel noch 2,33 (+/- 1,25) Rekombinationen im Dünndarm, bei 1,67 (+/- 0,33) Rekombinationen im Dickdarm (Tab.11, Abb. 7, 8).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Auch bei dieser Gruppe wurden Tiere ohne Tamoxifen, also mittels Applikation von reinem Speiseöl in den Dickdarm behandelt.

Zur Ermittlung einer möglichen Rolle des Alters der Tiere auf die Anzahl der Rekombinationsereignisse wurde das Durchschnittsalter berechnet. Es lag bei 11,05 Wochen (ohne Tamoxifen behandelte Tiere: 10,9 Wochen; mit Tamoxifen unterschiedlicher Konzentration behandelte Tiere: 11,2 Wochen). Somit konnte ein Einfluss des Alters auf die Unterschiede zwischen den Gruppen ausgeschlossen werden.

Tabelle 11: Übersicht der Rekombinationsereignisse der behandelten Reportertiere (RE SI: Rekombinationsereignisse Dünndarm, RE LI: Rekombinationsereignisse Dickdarm, SEM: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall)

Tier (Ifd. Nr.)	Altersdurchschnitt in Wochen	Konz. Tam. in μM	RE SI	Mittelwert +/- CI RE SI	RE LI	Mittelwert +/- CI RE LI	SEM RE SI	SEM RE LI
R01	10,9	0	1	1,33	0	0	0,33	0
R02		0	2	CI	0	CI		
R03		0	1	1,00-1,66	0	0,00-0,00		
R1	11,2	100	0	0,33	0	0,67	0,33	0,33
R2		100	1	CI	1	CI		
R3		100	0	0,00-0,66	1	0,34-1,00		
R4		250	1	2,33	2	1,67	1,25	0,33
R5		250	2	CI	1	CI		
R6		250	4	1,08-3,58	2	1,34-2,00		
R7		500	3	3	5	5,67	0,58	1,20
R8		500	2	CI	4	CI		
R9		500	4	2,42-3,58	8	4,47-6,87		
R10		1000	7	6,33	4	6,67	0,47	1,45
R11		1000	6	CI	9	CI		
R12		1000	6	5,86-6,80	7	5,22-8,12		

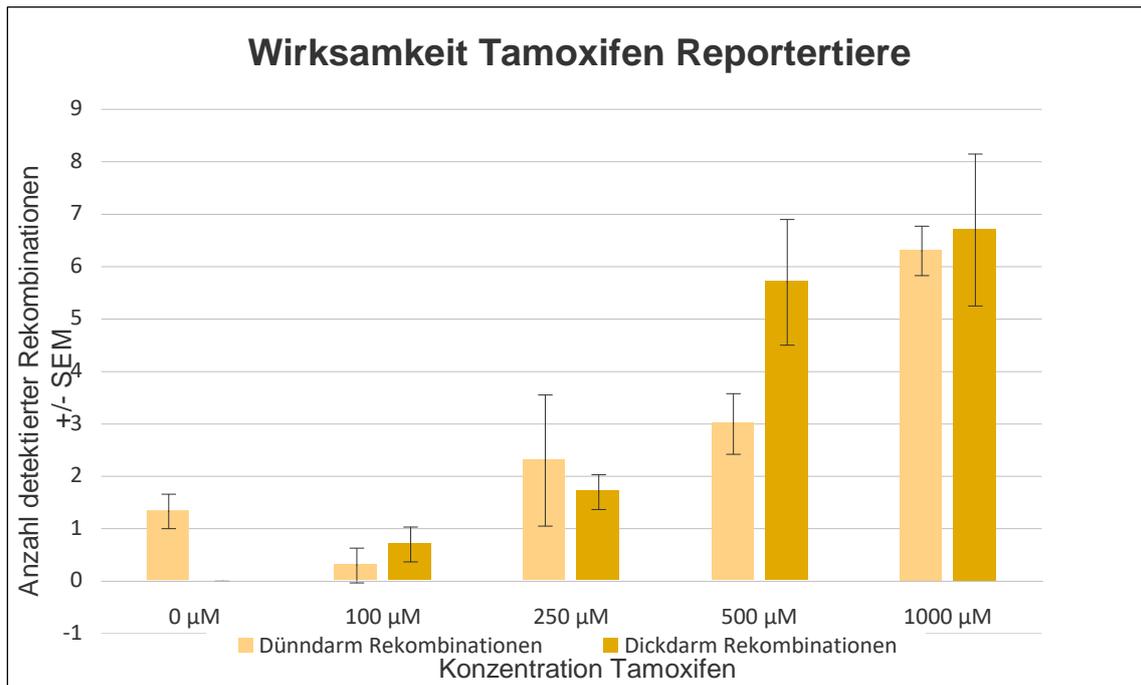


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Tamoxifenwirkung bei den Reportertieren

Bei den Reportertieren zeigten sich bei allen mit 0 µM Tamoxifen behandelten Tieren Rekombinationen im Dünndarm. Es ließen sich 1,3 +/- 0,33 Rekombinationen im Dünndarm detektieren.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

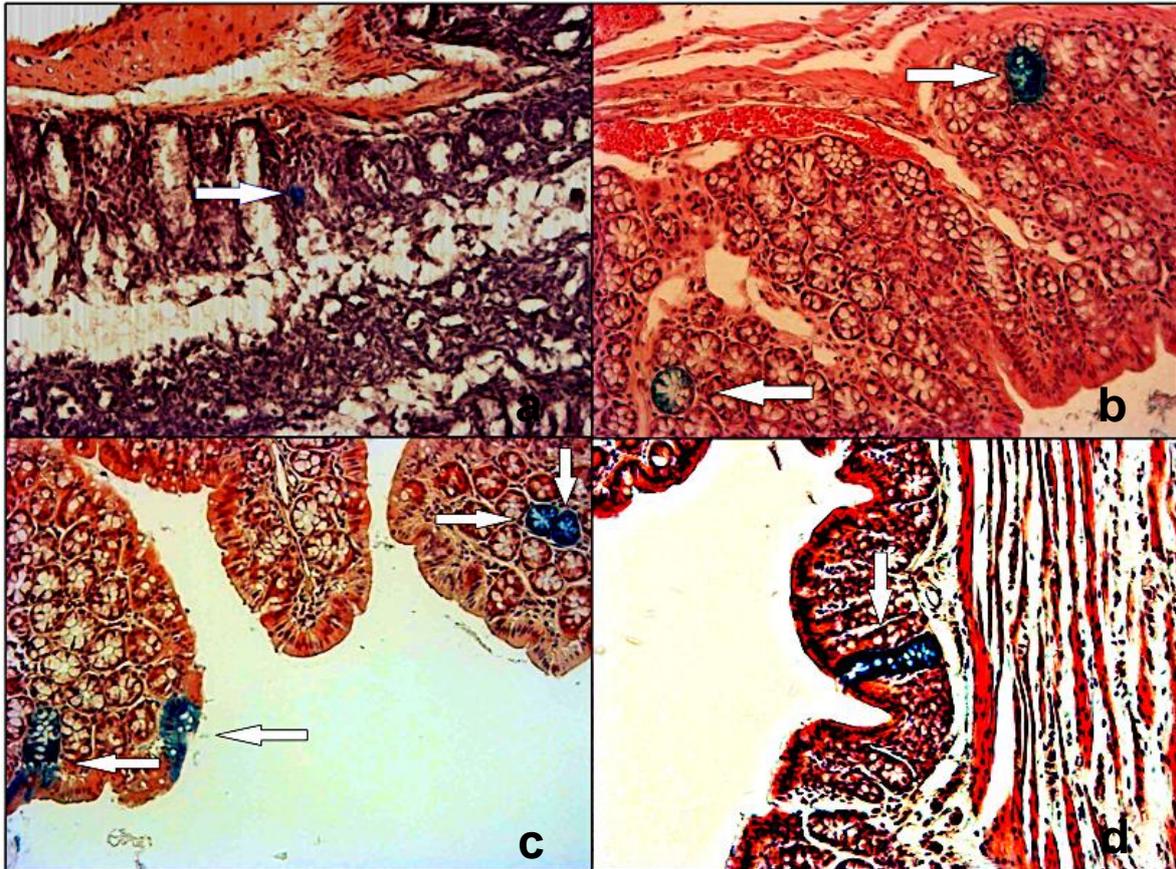


Abbildung 7: Histologische Darstellung der Rekombinationsereignisse der Reportertiere im Dickdarm

7a Dickdarm Reportermaus mit 100 µM Tamoxifen behandelt, 1 Rekombinationsereignis, 20-fach vergrößert **7b** Dickdarm Reportermaus mit 250 µM Tamoxifen behandelt, 2 Rekombinationsereignisse, 60-fach vergrößert **7c** Dickdarm Reportermaus mit 1000 µM Tamoxifen behandelt, 4 Rekombinationsereignisse, 60-fach vergrößert **7d** Dickdarm Reportermaus mit 1000 µM Tamoxifen behandelt, 1 Rekombinationsereignis im Anschnitt, 20-fach vergrößert



Abbildung 8: Histologische Darstellung der Rekombinationsereignisse der Reportertiere im Dünndarm, eine mit 1000 µM Tamoxifen behandelte Reportermaus mit Rekombinationsereignissen (Pfeile), 25-fach vergrößert

4.4 Tamoxifenwirkung - Tumortiere

Da davon auszugehen ist, dass die Anzahl der Dünndarmrekombinationen bei den Reporter-mäusen mit der Anzahl der potentiellen Tumoren bei den tumorbildenden Tieren korreliert, sind Dünndarmrekombinationen bei den Reportertieren unerwünscht. Aus diesem Grund entschieden wir uns zunächst für die Applikation von 50% derjenigen Tamoxifen-Konzentration, die bei den Reportertieren gerade noch zu Dünndarmrekombinationen führte, also für die Verwendung von 50 µM Tamoxifen bei den tumorbildenden Tieren. Weder die Konzentration von 50 µM noch die danach gewählte höhere Konzentration von 100 µM führte bei den tumorbildenden Tieren zu Tumoren. Auch 8 Wochen nach der Behandlung zeigte sich bei beiden Gruppen in der Koloskopie unauffällige Darmschleimhaut ohne Anzeichen von Tumoren. Die histologische Begutachtung des Darms beider Gruppen ergab ebenfalls keinen Hinweis auf Neoplasien (Tab. 12).

Aus diesem Grund war es notwendig, die Konzentration des eingebrachten Tamoxifens entsprechend zu erhöhen. Die nächsthöhere Konzentration von Tamoxifen war 250 µM. Von den so behandelten Tieren entwickelte eine von drei Mäusen einen Dickdarmtumor. Im

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Dünndarm der mit 250 µM behandelten Tiere detektierten wir histologisch 3,33 +/- 0,47 Tumoren. Wir entschieden uns bei noch zu wenigen Kolontumoren für die Anwendung höherer Konzentrationen.

Bei einer Verwendung von 500 µM Tamoxifen zeigte sich nach 8 Wochen im Kolon bei 4 von 5 Mäusen (0,8 +/- 0,2) eine Neoplasie, eine davon ein invasives Karzinom. Im Dünndarm dieser Tiere fanden wir histologisch 3,2 +/- 0,66 Tumoren. Auch hiervon war ein Tumor ein Karzinom, die übrigen waren Adenome.

Die höchste verwendete Tamoxifenkonzentration lag bei 1000 µM. Im histologischen Kolonpräparat identifizierten wir 1,17 +/- 0,40 Tumoren, dabei fanden wir bei einer Maus zusätzlich einen Polypenrasen im Kolon. Die histologische Begutachtung der Dünndarmpräparate der mit 1000 µM behandelten Tiere ergab 1,17 +/- 0,40 Tumoren (Abb. 10, 11).

Zum Vergleich wurden auch bei diesen Tieren einige mit 0 µM Tamoxifen behandelt. Analog zu den Adenovirustieren und den Reportertieren erfolgte hier die Applikation des Vehikels ohne Wirkstoff in das Kolon der Tiere. Das jeweilige Durchschnittsalter wurde ebenfalls berechnet. Zur weiteren Untersuchung wurden auch Tiere mit Vehikel behandelt, die bereits etwa doppelt so alt waren wie die mit Tamoxifen behandelten. Bei den jüngeren mit Vehikel behandelten Mäusen ließen sich weder makroskopisch noch mikroskopisch in Kolon oder Dünndarm Tumoren nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden wir bei allen (100%) der älteren mit Speiseöl behandelten Tiere jeweils ein (1,0 +/- 0) Dünndarmadenom (Abb.13). Auch makroskopisch ließen sich bei diesen Mäusen teilweise Dünndarmtumoren identifizieren (Abb.12).

Tabelle 12: Übersicht behandelte Tumortiere (Tm SI: Tumoren im Dünndarm, Tm LI: Tumoren im Dickdarm, SEM: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall)

Tier (Ifd. Nr.)	Altersdurchschnitt in Wochen	Konz. Tam.in µM	Tm SI	Mittelwert +/- CI Tm SI	Tm LI	Mittelwert +/- CI Tm LI	SEM Tm SI	SEM Tm LI
T01	14,7	0	0	0 CI 0,00-0,00	0	0 CI 0,00-0,00	0	0
T02		0	0		0			
T03		0	0		0			

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

T04	26,8	0	1	1 CI 1,00-1,00	0	0 CI 0,00-0,00	0	0
T05		0	1		0			
T06		0	1		0			
T1	13,5	50	0	0 CI 0,00-0,00	0	0 CI 0,00-0,00	0	0
T2		50	0		0			
T3		50	0		0			
T4		100	0	0 CI 0,00-0,00	0	0 CI 0,00-0,00	0	0
T5		100	0		0			
T6		100	0		0			
T7		250	4	3,33 CI 2,86-3,80	0	0,33 CI 0,00-0,66	0,47	0,33
T8		250	3		1			
T9		250	3		0			
T10		500	1	3,20 CI 2,54-3,86	0	0,80 CI 0,60-1,00	0,66	0,20
T11		500	4		1			
T12		500	3		1			
T13		500	5		1			
T14		500	3		1			
T15		500	Postop. ex		Postop. ex			
T16		1000	1	1,17 CI 1,37-2,17	0	1,17 CI 1,37-2,17	0,40	0,40
T17		1000	2		0			
T18		1000	0		1			
T19		1000	2		2			
T20		1000	2		2			
T21		1000	0		2			

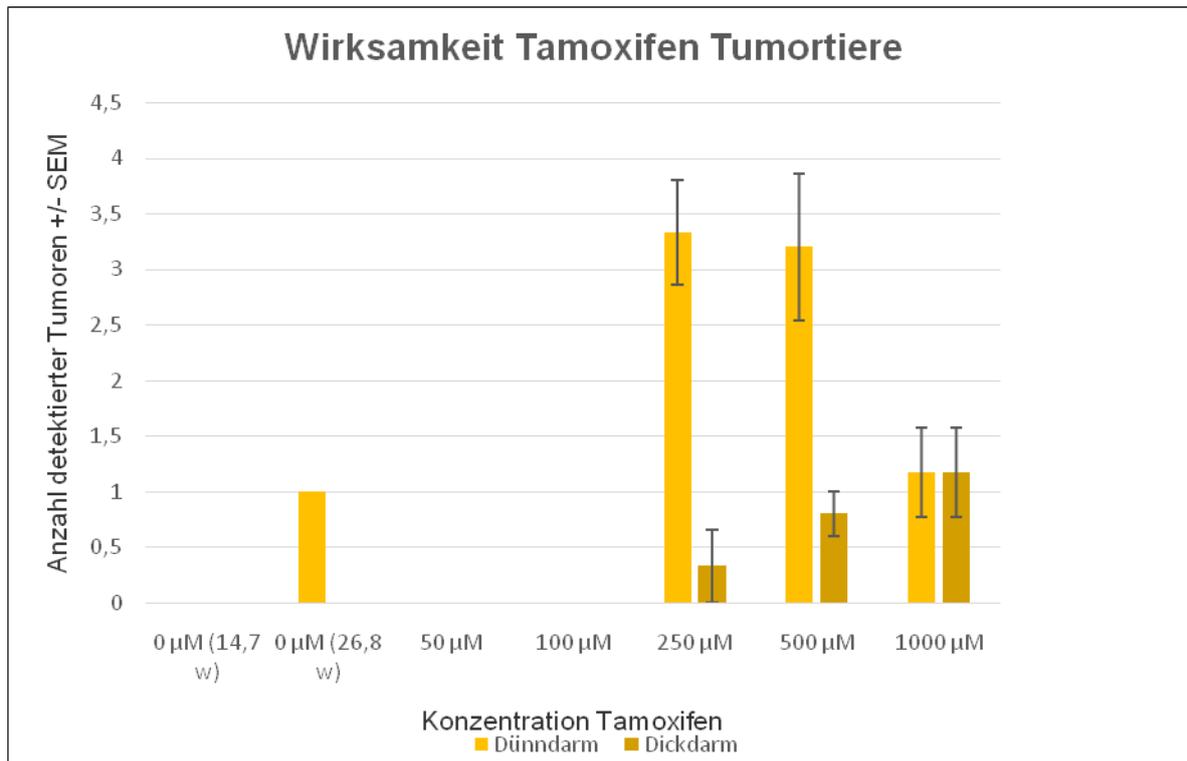


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Tamoxifenwirkung bei den Tumortieren

Insgesamt zeigte sich, dass in unseren Experimenten die Anzahl von Kolontumoren mit der Erhöhung der eingebrachten Tamoxifenkonzentration stieg. Die Anzahl der Dünndarmtumoren nahm mit steigender Konzentration von Tamoxifen tendenziell eher ab (Abb. 9).

Zum Teil waren innerhalb der Tumoren ulcerierte, teilweise serös oder blutig sezernierende, entzündlich veränderte und stenosierende Anteile nachweisbar, die insbesondere auch mit dem Endoskop nicht ohne erhebliche Perforationsgefahr zu überwinden waren (Abb. 10d). Es musste damit gerechnet werden, dass bei entsprechenden Mäusen die Nahrungspassage nicht mehr ausreichend und v.a. schmerzfrei möglich sein würde. Diese Tiere wurden folglich noch vor Ablauf des achtwöchigen Überwachungs- und Koloskopiezeitraums euthanasiert und Dün- und Dickdarm zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Dies betraf drei der sechs mit 500 μM behandelten Mäuse und zwei der sechs mit 1000 μM behandelten Tiere. Die frühere Euthanasie bei Tieren, die mit höheren Tamoxifen-Konzentrationen behandelt worden waren, erklärt die geringere Anzahl an Dünndarmadenomen bei höherer Tamoxifenkonzentration, da hier eine stochastische Entstehung von Dünndarmtumoren und damit größerer Anzahl dieser Läsionen in höherem Lebensalter zu beobachten war.

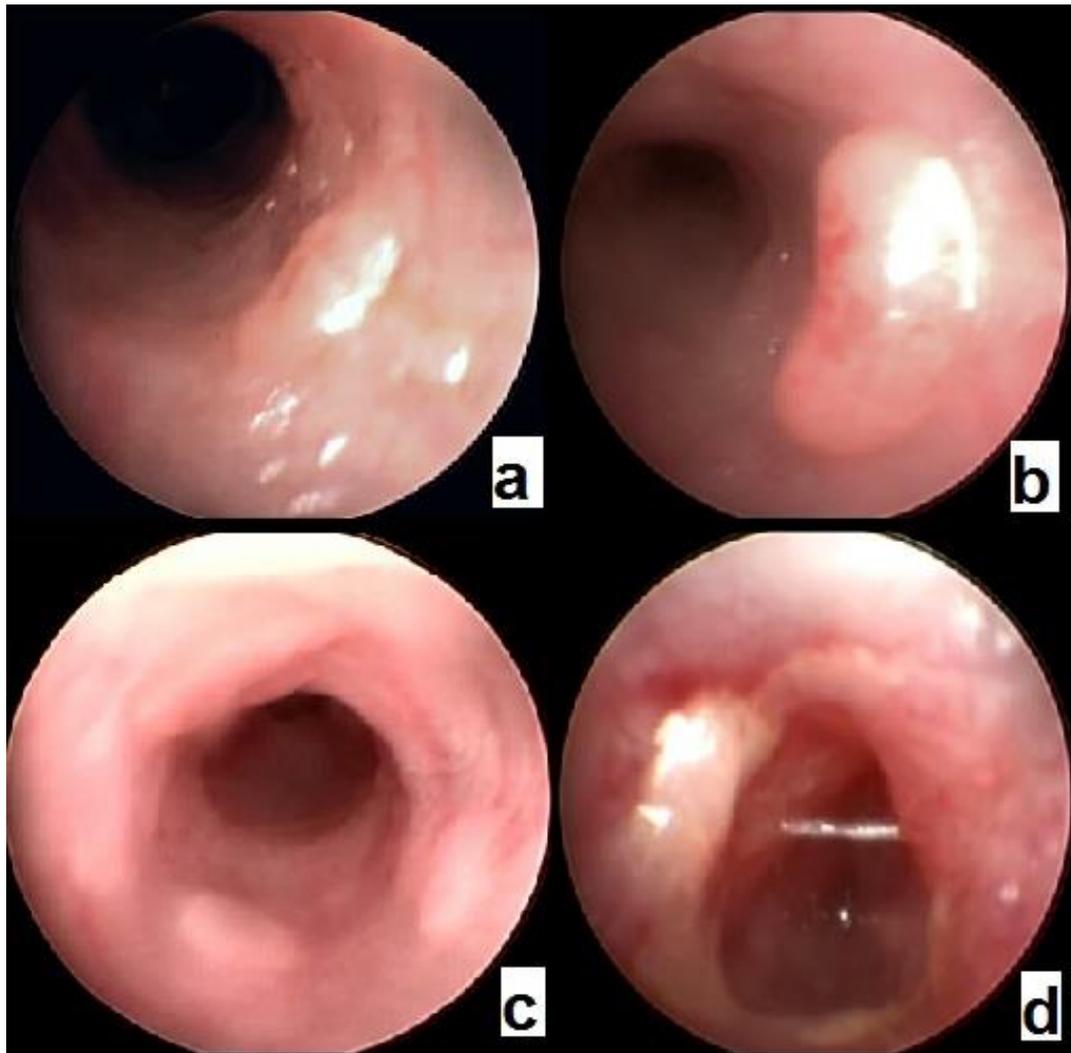


Abbildung 10: Koloskopische Begutachtung der Tumoren bei den Tumortieren

10a Tumor einer mit 500 μM Tamoxifen behandelten Maus zwei Wochen postoperativ

10b Gleicher Befund wie in 10a eine Woche später

10c Zirkulär angeordnete Tumoren einer mit 1000 μM Tamoxifen behandelten Maus eine Woche postoperativ

10d Gleicher Befund wie in 10c – eine Woche später, deutlich kontaktvulnerable Tumoranteile

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

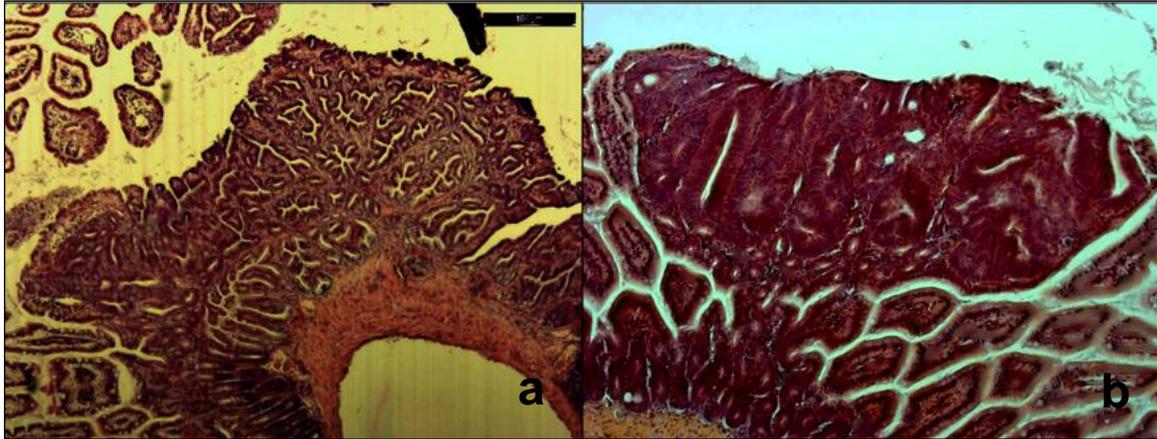


Abbildung 11: Histologische Untersuchung der Tumoren bei den Tumortieren

11a Tumor einer mit 500 μM Tamoxifen behandelten Maus, 12-fach vergrößert
11b Tumor einer mit 1000 μM Tamoxifen behandelten Maus, 12-fach vergrößert

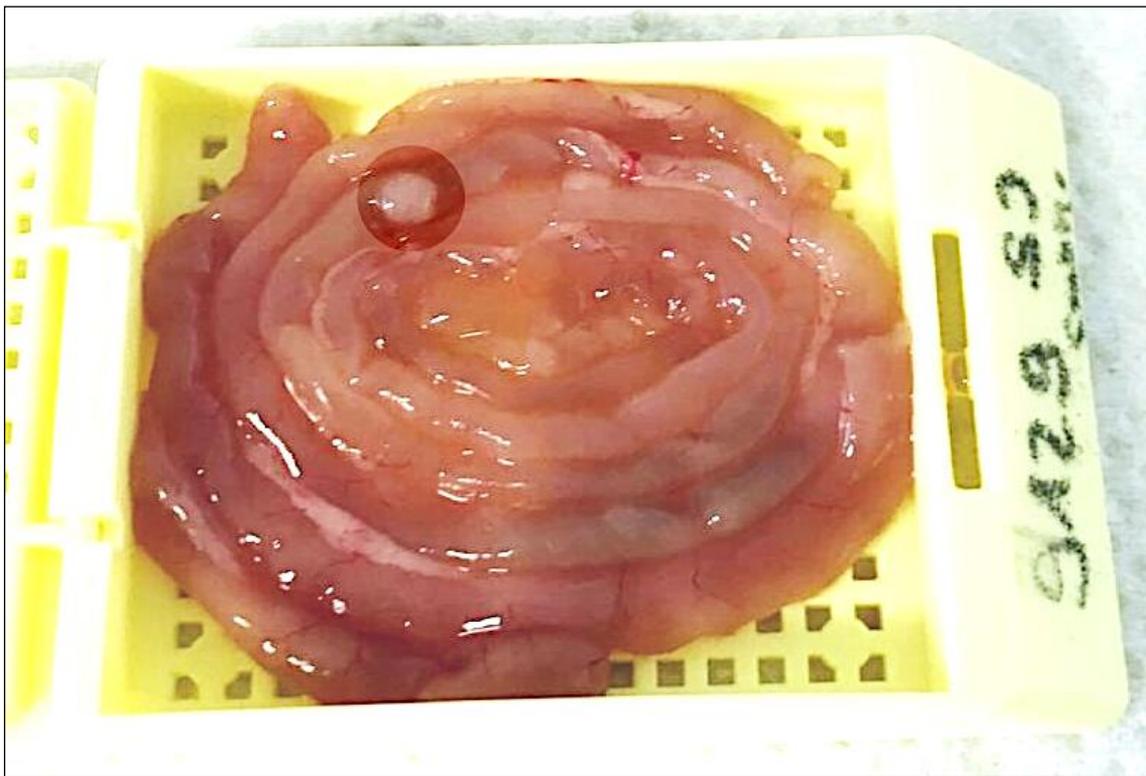


Abbildung 12: Darstellung eines makroskopisch sichtbaren Dünndarmtumors bei einem mit Vehikel behandelten Tumortier nach Organentnahme

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

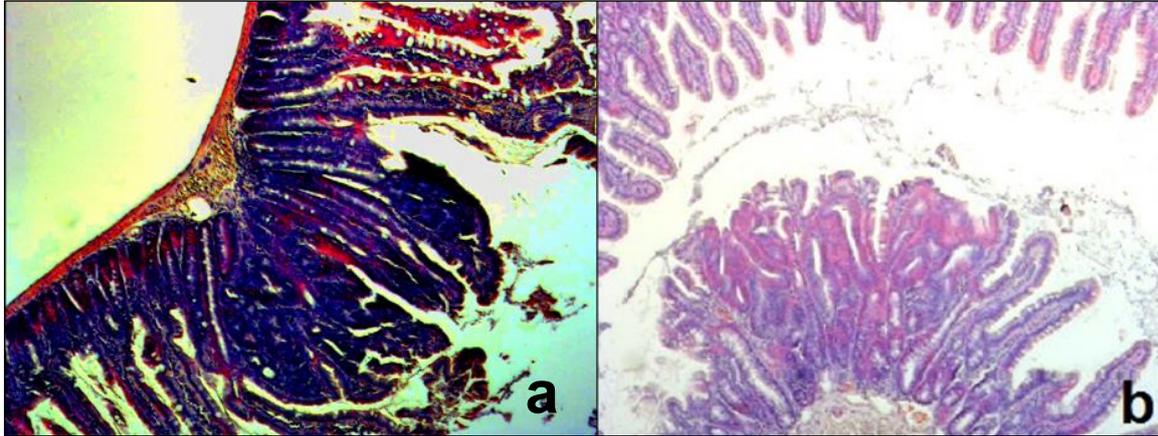


Abbildung 13: Histologische Darstellung von Tumoren von mit 0 μ M Tamoxifen behandelten Tumortieren

13a Adenom des Dünndarms einer mit 0 μ M behandelten Tumormaus, 12-fach vergrößert

13b Deutlich veränderte Zellarchitektur im Dünndarm einer mit 0 μ M Tamoxifen behandelten Tumormaus, 12-fach vergrößert

5. DISKUSSION

5.1 Allgemeines

Das CRC gehört zu den häufigsten Malignomen des Menschen. Morbidität und Mortalität sind nach wie vor inakzeptabel hoch. Weitere Forschung zur Krankheitsentstehung und neuen Therapieansätzen ist deshalb weiterhin notwendig. Hierzu werden Modelle benötigt, die die Erkrankung möglichst realistisch simulieren bei gleichzeitig einfacher Handhabung. Genetisch induzierte Mausmodelle (GEMM) werden diesen Anforderungen prinzipiell gerecht. Das Adenovirus-basierte GEMM des CRC erfordert jedoch zum einen hohe Sicherheitsstandards (S2) und ist durch die notwendige Operation zum anderen aufwändig in der Umsetzung. Aus diesem Grund planen wir im hier vorgestellten Projekt die Vereinfachung des Modells durch eine Umstellung der virusbasierten Tumorinduktion auf eine Tumorinduktion durch Tamoxifen.

Insgesamt ist festzustellen, dass nach Einkreuzen des Vil-Cre^{ERT2}-Allels die Tumorinduktion prinzipiell auch mit Tamoxifen möglich ist. Die Zahl der Dickdarntumoren stieg mit der Erhöhung der Tamoxifenkonzentration an, während die Zahl der Dünndarntumoren mit steigender Tamoxifenkonzentration eher abnahm. Dies ist vermutlich jedoch eher ein Artefakt, bei höherer Fallzahl ist anzunehmen, dass durch vermehrte systemische Wirkung von Tamoxifen auch die Inzidenz von Dünndarntumoren zunehmen würde.

Eine weitere interessante Feststellung ist, dass Tumoren ganz offensichtlich auch dann entstehen, wenn den Tieren kein Tamoxifen zugeführt wird. Diese „leakiness“, die ausschließlich im Dünndarm beobachtet werden konnte, ist vermutlich auf das hohe Expressionsniveau von Villin im Dünndarm bei gleichzeitiger sporadischer Rekombinaseaktivität trotz Estrogenrezeptorkopplung von Cre^{ERT2} zurückzuführen. So ist bei ausreichend hoher Expression auch ohne Tamoxifen gelegentlich mit Rekombinationsevents zu rechnen.

5.2 Methodik und Tiermodell

Das initiiierende Event aller malignen Erkrankungen ist die Entkopplung der Proliferation von zellulären Kontrollmechanismen, meist durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen. Das Prinzip genetisch induzierter Mausmodelle ist die Induktion von krankheitsbestimmenden Mutationen im Zielgewebe, was letztlich zum Entstehen der jeweiligen Tumorerkrankung führt. Die entstehenden Tumoren ähneln der menschlichen Erkrankung in aller Regel sowohl molekularbiologisch als auch klinisch stark. Anatomie und Physiologie der Maus sind darüber hinaus relativ vergleichbar mit der menschlichen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Anatomie und Physiologie, sodass auch das Versuchstier Maus gut geeignet ist. Zudem ist die Maus ein Versuchstier mit hoher Reproduktionsrate und vergleichsweise sehr geringen Haltungs- und Pflegeanforderungen (Belle, 2004).

Neben den Mausmodellen, die auf der Injektion von Tumorzellen basieren, existieren an genetisch induzierten Mausmodellen des CRC bislang vor allem solche zum hereditären kolorektalen Karzinom. Diese Modelle simulieren die Entstehung von FAP und HNPCC (Koratkar et al., 2004; Kucherlapati et al., 2010; Moser et al., 1995), können jedoch das sporadische CRC nur sehr eingeschränkt darstellen. Beim Menschen ist jedoch der überwiegende Anteil der CTCs auf sporadische Entstehung zurückzuführen; nur verhältnismäßig wenige CRC lassen sich auf die erblichen Formen FAP und HNPCC zurückführen. Das hier beschriebene Modell mit gezielten Veränderungen in den für die Karzinogenese ausschlaggebenden Genen in einem kleinen Abschnitt des Colons ist daher grundsätzlich gut geeignet, das sporadische CRC zu simulieren.

Das bereits bestehende Modell von Hung et al. wurde durch eine *Tp53*-Mutation ergänzt (Hung et al., 2010). Aufgrund der humanpathogenen Eigenschaften sollte die Umstellung der Tumorinduktion auf Tamoxifen erfolgen.

5.3 Einsatz der Reportertiere

Im Rahmen der Experimente zeigte sich, dass Reportertiere und tumorbildende Tiere unterschiedlich auf verschiedene Tamoxifenkonzentrationen reagierten. Bei den Reportertieren zeigte sich die Konzentration von 100 μM als wirksamste Konzentration im Kolon bei gleichzeitig geringster Rekombinationsrate im Dünndarm. Bei dieser Konzentration zeigten sich im Mittel noch 0,33 Dünndarmrekombinationen. Bei den Tumortieren konnten wir diese Konzentration jedoch nicht als beste bestätigen: Um bei den Tumortieren eine noch geringer ausgeprägte Rate an Dünndarmtumoren zu erreichen bzw. überhaupt keine Dünndarmtumoren zu verursachen, begannen wir bei diesen Tieren mit einer Konzentration von 50 μM . Weder bei dieser noch bei der nächst höheren und bestwirksamsten Konzentration bei den Reportertieren (100 μM) ließ sich allerdings im Kolon ein Tumor identifizieren. Auch im Dünndarm zeigten sich keinerlei Tumoren. Erst ab einer Konzentration von 250 μM und darüber ließen sich Kolontumoren finden. Hierbei stieg jedoch auch die Anzahl der Dünndarmtumoren erheblich an. Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der rekombinierten Krypten in Reportertieren und der Anzahl der Tumoren in den tumorbildenden Tieren legt den Verdacht nahe, dass das Reportertier die Tumorentwicklung nicht analog abbildet, also nicht jede Rekombination in Tumortieren auch zu einem Tumor

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

führt. So ist es denkbar, dass manche Tumoren bereits frühzeitig durch das Immunsystem eliminiert werden. Dieser Sachverhalt lässt an der Eignung der Reportertiere zweifeln.

Die Quantifizierung der Tamoxifenwirkung bei den Reportertieren funktioniert in unserem Modell über x-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid). Auch andere Substrate (z.B. 6-chloro-3-Indolyl- β -d-Galactopyranoside mit Nitrotetrazolium Blue Chloride) zur Visualisierung der Aktivität der β -Galaktosidase werden diskutiert. Die Verwendung dieses Stoffs ist der Nutzung von x-gal beispielsweise in Geweben mit hohen endogenen β -Galaktosidase-Expressionen bei leicht basischem pH-Wert überlegen (Merkwitz et al., 2016). Diese Problematik scheint als Erklärung für die von uns beobachtete Diskrepanz jedoch unwahrscheinlich.

Der wahrscheinlichste Grund für die Diskrepanz zwischen den Reporter- und den tumorbildenden Tieren ist die Rekombinationseffizienz: Cre exzidiert gefloخته Sequenzen in Abhängigkeit der Länge der gefloخته Sequenz mit unterschiedlicher Effizienz. Bei den tumorbildenden Tieren mussten nicht nur längere Sequenzen (*Apc*, *Tp53*, *Kras*) ausgeschnitten werden, sondern statt einem Allel gleich drei. Beim lacZ-Allel musste hingegen nur ein Stopcodon exzidiert werden, worin sich andererseits auch die hohe Effizienz dieses Allels als Cre-Reporter begründet. Es ist also gut möglich, dass die beispielweise durch 100 μ M Tamoxifen erreichte Cre-Aktivität zwar für das lacZ-Allel ausreichte, jedoch nicht alle onkogenen Allele der tumorbildenden Tiere aktivieren konnte.

5.4 Einsatz der Reagenzien zur Tumorinduktion

Das verwendete Adenovirus ist ein Virus aus der Gruppe der DNA-Viren. Die erstmalige Beschreibung dieser Viren und ihre Vermehrung in Zellkultur erfolgte 1953 (Rowe et al., 1953). Diese Viren sind beim Menschen vorrangig für Atemwegsinfektionen und Konjunktivitiden verantwortlich und potentiell humanpathogen. Die Arbeit mit dem Virus erfordert deshalb hohe Sicherheitsstandards (gentechnische Sicherheitsstufe S2) und erweiterte Anforderungen an den Versuchsaufbau und dessen Durchführung. Folglich war die Umstellung auf ein weniger aufwändiges Modell wünschenswert, um einfach, schnell, jedoch trotzdem zuverlässig Tumoren zu erzeugen.

Das Modell von Hung et al. und damit das verwendete Goldstandardmodell als Grundlage dieser Arbeit arbeitet mit Hilfe eines Adeno-cre Virus. Dieses Virus überträgt als Vektor die Cre-Rekombinase. Im von uns modifizierten Modell ist die Cre-Rekombinase in der Keimbahn der Maus kodiert, steht jedoch unter der Kontrolle des Villin-Promotors, wird also nur in intestinalen Epithelien exprimiert. Außerdem liegt sie in einer konditionellen,

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

tamoxifen-induzierbaren Form (Cre^{ERT2}) vor. Das Enzym nimmt seine Funktion zwar wie oben beschrieben theoretisch erst nach Überführung in den Zellkern (nach Kopplung mit Hydroxytamoxifen) auf, jedoch verhindert die Kopplung von Cre an den modifizierten Estrogenrezeptor (ERT2) die nukleäre Translokation nicht vollständig; eine geringe „leakiness“ i.S. von spontanem Übertritt von Cre in den Nucleus und damit eine Cre-Aktivität ohne Tamoxifen-Einfluss ist weiterhin vorhanden. Einige Ergebnisse der hier vorgestellten Versuche lassen sich nur mit einer spontanen Cre-Aktivität erklären: Alle Reporter-mäuse, die niemals mit Tamoxifen behandelt worden waren und folglich eigentlich keine Cre-Aktivität aufweisen sollten, entwickelten im Dünndarm Rekombinationsevents. Auch die tumorbildenden Tiere entwickelten ab einem bestimmten Alter (die hierfür untersuchten Tiere waren 26,8 Wochen alt) spontane Dünndarmadenome, ohne dass sie mit Tamoxifen in Kontakt gekommen waren.

Eine spontane Aktivität der Cre-Rekombinase und somit die „leakiness“ der Villin-Cre^{ERT2}-Tiere erscheint daher gesichert. Villin tritt sowohl im Dün- als auch im Dickdarm auf (El Marjou et al., 2004). Das überwiegende Auftreten der spontanen Rekombinationen im Dünndarm ist durch die vermutlich höhere Aktivität des Villin-Promotors im Dünndarm verglichen mit dem Dickdarm zu erklären.

5.5 Auswahl des Promotors

Bei Verwendung des Adenovirus als Cre-Vektor ist der Untersucher nicht auf einen zuverlässigen Promoter angewiesen, da das Virus wie oben beschrieben erst zum gewünschten Zeitpunkt und nur lokal durch chirurgische Einbringung in das Kolon seine Aufgabe erfüllt. Jedoch muss man damit rechnen, dass das Virus potentiell jede Körperzelle infizieren kann. Will man das Modell auf die virusungebundene Variante umstellen, bei der die Cre-Rekombinase prä-existent ist, erfordert dies, dass das Enzym nur in bestimmten Zellen wirksam wird, da Tamoxifen zwar lokal appliziert werden kann, durch seine Lipophilie und damit verbundene einfache Resorption aber immer auch eine systemische Wirkung hat.

In unserem Modell wählten wir den Villin-Promotor als intestinal gewebsspezifischen Promotor. Als Baustein von Aktinfilamenten erfüllt Villin eine wichtige Aufgabe in der Motilität der intestinalen Mikrovilli (Matsudaira und Burgess 1979; Bretscher 1983). Folglich findet man Villin sowohl in Dün- als auch in Dickdarmzellen, das Expressionsniveau ist jedoch im Dünndarm weitaus höher. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen: Die Mäuse entwickelten mit steigender Konzentration an zugeführtem Tamoxifen zunehmend auch

mehr Dünndarmtumoren. Wir konnten sowohl Adenome als auch Karzinome im Dünndarm der Tiere identifizieren. Hieraus ergibt sich eine unzureichende Spezifität des verwendeten Promotors für das Kolon. Da Dünndarmtumoren in der Maus in der Regel früher symptomatisch werden als Dickdarntumoren, ist es jedoch notwendig, nahezu ausschließlich Dickdarntumoren erzeugen zu können. Die Bildung von Adenomen oder gar Karzinomen im Dünndarm ist hierbei unerwünscht und belastet nicht zuletzt v.a. die Versuchstiere.

Es gibt verschiedene Ansätze die Mausmodelle zur Erzeugung von kolorektalen Karzinomen hinsichtlich der Promoterauswahl zu verbessern. Die meisten Ansätze zielen dabei vorrangig auf die Vermeidung von Dünndarmtumoren ab. Beispielsweise wurde von Tuveson et al. eine Möglichkeit beschrieben, als Promoter das fattyacidbindingprotein (FaBP) zu verwenden (Tuveson et al., 2004). Dieser Promoter führt jedoch zur Expression in allen Darmabschnitten (Ileum >Zökum> Kolon > Duodenum = Jejunum) und auch in der Blase (Saam and Gordon, 1999). Seine Eignung ist daher begrenzt. Ein anderer Ansatz ist die Bindung eines SV40 large T Antigens an den intestinal trefoilfactor gene Promoter (Gum et al., 2004). Dieser Ansatz resultiert jedoch v.a. in der Bildung von Tumoren ausgehend von den enteroendokrinen Zellen. Die sich entwickelnden neuroendokrinen Tumoren des Kolons sind jedoch beim Menschen nicht nur sehr selten, sondern stellen eine eigene, vom kolorektalen Adenokarzinom unabhängige Krankheitsentität dar.

Ein jüngerer Ansatz zur Entwicklung eines Kolon-spezifischen Promotors ist die Verwendung des Carboanhydrase I (Car1)-Promotors zur Expression von Cre^{ERT2} (Tetteh et al., 2016). Car1-CreERT2 in Kombination mit konditionellen Mutationen in verschiedenen Onkogenen führen zu einer isolierten Tumorbildung im Kolon. Nachteilig ist hierbei jedoch die Lokalisation im proximalen Kolon, die ein Monitoring per Koloskopie ausschließt, sowie die große Anzahl der Tumoren, die der menschlichen Erkrankung, die üblicherweise nicht multifokal auftritt, nicht entsprechen.

5.6 Einfluss des Alters der Tiere auf die Tumorinduktion

Wie oben bei den Reportertieren beschrieben zeigte sich auch bei den tumorbildenden Tieren, dass ältere Mäuse auch ohne Tamoxifen Tumoren entwickelten. Dies lässt sich wiederum durch die Tamoxifen-unabhängige Rekombinationsaktivität von Cre^{ERT2} erklären. Auch ohne Zugabe von Tamoxifen katalysiert das Enzym offenbar die Aktivierung des beteiligten (Proto)-Onkogens und Inaktivierung der Tumorsuppressorgene. Da solche spontanen Rekombinationsereignisse jedoch sehr viel seltener als die Tamoxifen-

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

vermittelten sind, sind die Tiere, die so Tumoren entwickeln, im Mittel deutlich älter als die Tamoxifen-induzierten Tiere. Unbehandelte Tiere mit konditionellen Onkogenen, jedoch ohne das Villin-Cre^{ERT2}-Allel entwickelten erwartungsgemäß keine Tumoren.

In unseren Untersuchungen waren spontane Tumoren in den Villin-Cre^{ERT2}; Apc^{fl/fl}; Kras^{G12D}; Tp53^{R172H} Tieren frühestens ab einem Alter von etwa 27 Wochen, also etwa ab einem halben Jahr zu finden. Der Zeitpunkt des spontanen Auftretens von Tumoren ist jedoch aufgrund seiner stochastischen Natur sehr variabel und kann nicht vorhergesagt werden. Der Ansatz, den Mäusen die Operation zu ersparen und lediglich abzuwarten bis sich Tumoren spontan entwickeln, erscheint deshalb nicht praktikabel. Zusätzlich ist nicht vorherzusehen, wo im Dün- und Dickdarm die Tumoren entstehen, sodass ein Screening und Staging durch Koloskopie bei diesem Ansatz nicht möglich wäre.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Umstellung des bereits bestehenden, auf Adeno-Cre basierenden Modells auf die Tumorinduktion durch Tamoxifen erscheint prinzipiell möglich, steht in der hier vorgestellten Form jedoch vor Problemen: Die Verwendung des nicht Kolon-spezifischen Promotors Villin und die „leakiness“ von Cre^{ERT2} stellen Probleme dar, welche die Tumorinduktion nicht verlässlich genug machen. Diese Schwierigkeiten gilt es in künftigen Ansätzen zu dieser Thematik zu lösen. Eine Umstellung der Tumorinduktion auf das Tamoxifen-Modell ist bei Verwendung von Villin-Cre^{ERT2} deshalb nicht sinnvoll. Der Goldstandard mit Verwendung des Adenovirus muss derzeit als deutlich verlässlicher angesehen werden und sollte daher aktuell vorrangig Verwendung finden.

Mittels Koloskopie ist es nur möglich, den distalen Bereich (etwa 3 cm ab ano) des Kolons zu beurteilen. Eine hinreichende Beurteilung des Dünndarms oder des weiter oral gelegenen Kolons ist nicht möglich. Folglich ist es ohne Bildgebung erst postmortal möglich, auch Tumoren im Dünndarm zu identifizieren und zu quantifizieren. Auch die endgültige Beurteilung der mittels Koloskopie identifizierten Dickdarmtumoren erfolgte erst nach histologischer Aufarbeitung.

Die hier berichteten Ergebnisse konnten folglich nur mittels relativ aufwändiger und zeitintensiver Methodik gewonnen werden. Jedes einzelne Tier musste im Rahmen des Experiments operiert und über einen langen Zeitraum beobachtet und koloskopiert werden. Die Operation und die Koloskopie erfordern aufgrund der Größe des Tieres und dem dadurch nur eingeschränkt übersichtlichen Situs entsprechende Übung durch den Operateur bzw. Untersucher. Aus diesem Grund ist es über die bloße Umstellung der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Tumorinduktion auf ein nicht-virales Medium hinaus anzustreben, technisch einfachere Methoden zur Tumorinduktion zu entwickeln. Möglicherweise eignet sich hierzu der Versuch, die Methode des operativ eingebrachten Tamoxifens bzw. Adenovirus auf eine Art Klyisma umzustellen. Hierfür wäre u.a. zu prüfen, ob es eine Möglichkeit gibt, ein Darmsegment der Maus ähnlich dem operativen Verfahren auch bei einem rektalen Einlauf - beispielsweise durch einen Doppelballonkatheter- zu isolieren, um zu gewährleisten, dass das eingebrachte Medium nur lokal wirkt. Es bleibt abzuwarten, ob es mittels einer solchen Methode möglich ist, auch die Kryptenbasis und damit Zellen mit Stammzeleigenschaften als den eigentlichen Wirkort des Tamoxifens bzw. Adenovirus zu erreichen. Basis solcher Versuche muss jedoch stets die sichere und ausschließlich lokal wirkende Tumorinduktion durch Tamoxifen sein. Wie aus den hier vorgestellten Daten ersichtlich wird, ist dies noch nicht gegeben, was weitere Forschungsarbeiten nötig macht, beispielsweise mit dem inzwischen verfügbaren Car1-Cre^{ERT2}-Allel (Wang et al., 2016, Tetteh et al., 2016).

Da eine derartige Methode zur Tumorinduktion voraussichtlich eine deutlich kürzere Narkosezeit für die Tiere, eine geringere Invasivität und nicht zuletzt eine wesentliche Zeitersparnis mit sich bringen würde, wäre dies aus meiner Sicht ein wertvoller Ansatz für weitere Experimente auf diesem Gebiet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Optimierung eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms

Hintergrund: Nachgewiesenermaßen entwickeln sich auch die sporadischen Formen des CRC oftmals aus Kolonadenomen. Verschiedene Mutationen tragen dann zur Entartung bei. Hierzu zählen v.a. Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen *APC* und *TP53* sowie im Onkogen *KRAS*. Es wurde ein etabliertes Mausmodell weiter modifiziert. Grundlage für die Kontrolle der dann enthaltenen *APC*-, *KRAS*-, und *TP53*-Mutationen, ist das Floxen der entsprechenden DNA Abschnitte und Ausschneiden durch die Cre-Rekombinase. Im Anschluss wird die Mutation wirksam. Im bereits bestehenden Modell erfolgt die Tumorinduktion durch Zugabe der Cre-Rekombinase via Adenovirus. **Fragestellung:** Ziel dieser Arbeit ist es, die Tumorinduktion im bestehenden Mausmodell Adenovirus aufgrund der humanpathogenen Eigenschaften des Adenovirus auf die Tumorinduktion durch den selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen umzustellen. **Methodik:** Hierfür benötigt man ein Modell, welches sowohl die geflochten Gene beinhaltet, als auch eine örtliche Mutationskontrolle enthält. Die örtliche Kontrolle erfolgt über die Verwendung des darmspezifischen Promotors Villin. Da die bestwirksamste Tamoxifendosis unbekannt ist, haben wir Reportertiere verwendet. Bei diesen Tieren findet man im histologischen Präparat nach Rekombination blau gefärbte Darmabschnitte, sodass über quantitative Bestimmung Rückschlüsse auf die passende Dosis gezogen werden können. Die ermittelte Tamoxifendosis wird dann an den tumorbildenden Tieren angewandt. Alle Tiere werden dafür operiert und das Tumorinduktionsmedium (Virus/Tamoxifen) in ein ausgeklemmtes Kolonsegment appliziert. **Ergebnisse:** Nach Anwendung von 500 µM Tamoxifen entwickelten die Tiere Kolontumoren. Jedoch konnten weder bei geringerer noch bei höherer Konzentration Dünndarmtumoren ausgeschlossen werden. Zudem kam es auch ohne Tamoxifenzugabe zu spontaner Tumorentwicklung bei älteren Tieren. **Schlussfolgerungen:** Es wurde gezeigt, dass die Tumorinduktion durch Tamoxifen nicht so zuverlässig ist, wie die Induktion mittels Adenovirus. Dies liegt zum einen daran, dass die Cre-Rekombinase im neuen Modell in den Versuchstieren präexistent ist und durch Eigenaktivität auch ohne Tamoxifenapplikation zur Tumorentstehung führt. Zum anderen kann durch den Promotor Villin keine ausreichende Kolonspezifität erreicht werden, da Villin sowohl im Kolon als auch im Dünndarm exprimiert wird, sodass auch dort Tumoren entstehen. Es kann daher derzeit keine Umstellung des Modells auf die Tumorinduktion durch Tamoxifen erfolgen.

7. SUMMARY

Conversion of a mouse model of colorectal carcinoma to tumor induction by tamoxifen

Background: It has been proven that the sporadic forms of CRC often develop from colonadenomas. Various mutations then contribute to the degeneration. These include changes in the tumour suppressor genes APC and TP53 as well as in the oncogene KRAS. An established mouse model was further modified. The basis for the control of the APC, KRAS and TP53 mutations is the floxing of the corresponding DNA sections and cutting out by the Cre recombinase. Subsequently, the mutation becomes effective. In the existing model, tumor induction is achieved by adding Cre recombinase via adenovirus. **Objective:** The aim of this work is to switch tumor induction in the existing mouse model adenovirus to tumor induction by the selective estrogen receptor modulator tamoxifen due to the human pathogenic properties of the adenovirus. **Methods:** This requires a model containing both the floxed genes and a local mutation control. Local control is achieved by the use of the gut-specific promoter villin. Since the most effective dose of tamoxifen is unknown, we have used reporter animals. After recombination, blue-colored intestinal sections can be found in the histological preparation of these animals so that conclusions can be drawn about the appropriate dose by quantitative determination. The determined tamoxifen dose is then applied to the tumor-forming animals. All animals are operated for this and the tumor induction medium (virus/ Tamoxifen) is applied into a pinched colon segment. **Results:** After application of 500 μ M Tamoxifen the animals developed colon tumors. However, no tumors of the small intestine could be excluded at lower or higher concentrations. In addition, even without the addition of tamoxifen, tumour development in older animals could be delayed. **Conclusions:** It was shown that tumor induction by tamoxifen is not as reliable as induction by adenovirus. This is partly due to the fact that the Cre recombinase is pre-existent in the experimental animals in the new model and leads to tumour development through its own activity even without the application of tamoxifen. On the other hand, the promoter villin cannot achieve sufficient colon specificity, since villin is expressed both in the colon and in the small intestine, so that tumours also develop there. Therefore, it is currently not possible to switch the model to tumor induction by tamoxifen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Amtsfeld, L. (2017). Etablierung und Charakterisierung eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms, Med. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus - Liebig - Universität Gießen.

Arends, J.W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J. Pathol.* 190, 412–416.

Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., and Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest. Cancer Res.* 5, 19–27.

Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* 4, 365–370.

Belle, M.A. (2004). Zuchtdaten zu Körpergewicht, Fruchtbarkeit und Aufzuchtleistung der Schleißheimer Mäusestämme zwischen 1990 und 2001, Med. Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig - Maximilians - Universität München.

Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.

Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., and Vogelstein, B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293–297.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 129, 865–877.

Bretscher, A. (1983). Molecular architecture of the microvillus cytoskeleton. *Ciba Found Symp* 95, 164–179.

Bretscher, A., and Weber, K. (1979). Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 2321–2325.

Byun, A.J., Hung, K.E., Fleet, J.C., Bronson, R.T., Mason, J.B., Garcia, P.E., and Crott, J.W. (2014). Colon-specific tumorigenesis in mice driven by Cre-mediated inactivation of Apc and activation of mutant Kras. *Cancer Lett.* 347, 191–195.

Chang, E.H., Gonda, M.A., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., and Lowy, D.R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4848–4852.

Clark, M.E., and Smith, R.R. (2014). Liver-directed therapies in metastatic colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 5, 374–387.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Dangles-Marie, V., Pocard, M., Richon, S., Weiswald, L.-B., Assayag, F., Saulnier, P., Judde, J.-G., Janneau, J.-L., Auger, N., Validire, P., et al. (2007). Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res.* 67, 398–407.

Day, D.W., and Morson, B.C. (1978). The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl. Pathol.* 10, 58–71.

Donadon, M., Ribero, D., Morris-Stiff, G., Abdalla, E.K., and Vauthey, J.-N. (2007). New {Paradigm} in the {Management} of {Liver}-{Only} {Metastases} {From} {Colorectal} {Cancer}. *Gastrointest. Cancer Res.* 1, 20–27.

Dudouet, B., Robine, S., Huet, C., Sahuquillo-Merino, C., Blair, L., Coudrier, E., and Louvard, D. (1987). Changes in villin synthesis and subcellular distribution during intestinal differentiation of HT29-18 clones. *J. Cell Biol.* 105, 359–369.

Evans, J.P., Sutton, P.A., Winiarski, B.K., Fenwick, S.W., Malik, H.Z., Vimalachandran, D., Tweedle, E.M., Costello, E., Palmer, D.H., Park, B.K., et al. (2016). From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 98, 94–105.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., and Lemeur, M. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *93*, 10887–10890.

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 752–757.

Feil, S., Valtcheva, N., Feil, R., Parkitna, J.R., Engblom, D., Tessarollo, L., Palko, M.E., Akagi, K., Coppola, V., Ku, R., et al. (2009). Inducible Cre Mice. *Gene* 530, 15–27.

Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 26, 1268–1286.

Geissler, M., and Graeven, U. (2005). *Das kolorektale Karzinom : evidenzbasierte Leitlinien* (Stuttgart: Thieme), 3, 48, 68.

Gum, J.R., Hicks, J.W., Crawley, S.C., Yang, S.C., Borowsky, A.D., Dahl, C.M., Kakar, S., Kim, D.H., Cardiff, R.D., and Kim, Y.S. (2004). Mice expressing SV40 T antigen directed by

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

the intestinal trefoil factor promoter develop tumors resembling human small cell carcinoma of the colon. *Mol. Cancer Res.* 2, 504–513.

Herold, G. (2013). *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis* (Köln: Herold), 490.

Holmes, D. (2015). OUTLOOK COLORECTAL CANCER A DISEASE OF GROWTH. *Nature* 521, 2–3.

Horwitz, J.P., CHUA, J., CURBY, R.J., TOMSON, A.J., DAROOGHE, M.A., FISHER, B.E., MAURICIO, J., and KLUNDT, I. (1964). SUBSTRATES FOR CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF ENZYME ACTIVITY. I. SOME SUBSTITUTED 3-INDOLYL-BETA-D-GLYCOPYRANOSIDES. *J. Med. Chem.* 7, 574–575.

Huels, D.J., and Sansom, O.J. (2015). Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 113, 1–5.

Hung, K.E., Maricevich, M. a, Richard, L.G., Chen, W.Y., Richardson, M.P., Kunin, A., Bronson, R.T., Mahmood, U., and Kucherlapati, R. (2010). Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1565–1570.

Jackman, R.J., and Mayo, C.W. (1951). The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg. Gynecol. Obstet.* 93, 327–330.

Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., and Stegmaier, C. (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 19, 38.

Kiernan, J.A. (2007). Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotech. Histochem.* 82, 73–103.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.

Koratkar, R., Silverman, K.A., Pequignot, E., Hauck, W.W., Buchberg, A.M., and Siracusa, L.D. (2004). Analysis of reciprocal congenic lines reveals the C3H/HeJ genome to be highly resistant to ApcMin intestinal tumorigenesis. *Genomics* 84, 844–852.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784–1787.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Kucherlapati, M.H., Lee, K., Nguyen, A.A., Clark, A.B., Jr, H.H., Rosulek, A., Li, H., Yang, K., Fan, K., Lipkin, M., et al. (2010). An Msh2 Conditional Knockout Mouse for Studying Intestinal Cancer and Testing Anti-cancer Agents. *Gastroenterology* 138, 993–1002.

Kullmann, F. (2003). Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. *Internist (Berl)*. 44, 254–255, 258–267.

Küster, K. (2009). Die funktionelle Bedeutung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors (CAR) im kolorektalen Karzinom, Med. Dissertation, Mathematisch - naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Potsdam.

Lane, D.P., and Benchimol, S. (1990). P53: Oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.* 4, 1–8.

El Marjou, F., Janssen, K.-P., Hung-Junn Chang, B., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39, 186–193.

Matsudaira, P.T., and Burgess, D.R. (1979). Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 83, 667–673.

Merkwitz, C., Blaschuk, O., Schulz, A., and Ricken, A.M. (2016). Comments on Methods to Suppress Endogenous β -Galactosidase Activity in Mouse Tissues Expressing the LacZ Reporter Gene. *J. Histochem. Cytochem.* 64, 579–586.

Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 470–476.

Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6991–6995.

Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling Interplay in Ras Superfamily Function. *Curr. Biol.* 15, R563–R574.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.

Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., McNeley, M.K., Shoemaker, A.R., and Dove, W.F. (1995). ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur. J. Cancer (Oxford, Engl. 1990)* 31A, 1061–1064.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847–860.

Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001107.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.

Pox, C.L.O., and Schmiegel, W. (2014), Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 - Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, AWMF - Registrienummer: 021 - 007OL, URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0html>, [Stand: gültig bis 13.06.2018]: 26 - 36, 147 - 8.

Rassow, J. (2008). *Biochemie* (Stuttgart: Georg Thieme), 527 - 8, 560.

Rowan, A.J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W.F., and Tomlinson, I.P. (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3352–3357.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., and Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 570–573.

Ruhenstroth, M. (2007). *Laborjournal online: Stichwort - Wnt-Signalweg*, Ausgabe 01/2007, [Aktualisiert am 15.03.2007, Aufruf am 25.11.2016], URL: http://www.laborjournal.de/rubric/archiv/Stichwort/w_07_01.lasso

Saam, J.R., and Gordon, J.I. (1999). Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *J. Biol. Chem.* 274, 38071–38082.

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5166–5170.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295–308.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 7–30.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J. V, Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., and Wolf, C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9433–9438.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70–71.

Sternberg, N. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J. Mol. Biol.* 150, 603–608.

Tan, C., and Du, X. (2012). KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 18, 5171–5180.

Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell* 99, 67–86.

Tetteh, P.W., Kretzschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Morsink, F., Farin, H., van Es, J.H., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2016). Generation of an inducible colon-specific Cre enzyme mouse line for colon cancer research. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 11859–11864.

Tuveson, D.A., Shaw, A.T., Willis, N.A., Silver, D.P., Jackson, E.L., Chang, S., Mercer, K.L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., et al. (2004). Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5, 375–387.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* 10, 842–857.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Wagener, C., and Müller, O. (2010). *Molekulare Onkologie : Entstehung, Progression, klinische Aspekte* (Stuttgart: Thieme).

Wang, F., Johnson, R.L., Snyder, P.W., DeSmet, M.L., and Fleet, J.C. (2016). An Inducible, Large-Intestine-Specific Transgenic Mouse Model for Colitis and Colitis-Induced Colon Cancer Research. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1069–1079.

Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., et al. (2002). Initial sequencing and

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.

Wittinghofer, A., and Pai, E.F. (1991). The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 16, 382–387.

Xue, Y., Johnson, R., Desmet, M., Snyder, P.W., and Fleet, J.C. (2010). Generation of a transgenic mouse for colorectal cancer research with intestinal cre expression limited to the large intestine. *Mol. Cancer Res.* 8, 1095–1104.

Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., and Reth, M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 543–548.

Zutphen, L.F.M. van., Hackbarth, H., Baumans, V., Beynen, A.C., and Hackbarth, H. (1995). *Grundlagen der Versuchstierkunde: ein Beitrag zum tierschutzgerechten Umgang mit Versuchstieren und zur Qualität tierexperimenteller Ergebnisse ; mit 38 Tabellen* (Stuttgart [etc.]: G. Fischer).

9. DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen herzlich bedanken, die mich beim Erstellen dieser Dissertationsschrift hilfsbereit und ermutigend unterstützt haben. Ohne die umfassende Unterstützung wäre mir das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Sebastian Schölch, der mir das Erarbeiten meines Themas in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Er hat mir von Anfang an stets mit offenem Ohr, motivierendem und unterstützendem Rat und konstruktiver Kritik zur Seite gestanden und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Damit im Zusammenhang stehend bedanke ich mich bei der gesamten AG Schölch und dem Laborteam für verständnisvolle Worte und wertvolle Hilfestellung bei den praktischen Arbeiten. Mein Dank gilt hierbei insbesondere Doreen Werchau und Susann Kochall, die mir bei Fragen stets zur Verfügung standen und mich aufmerksam und hilfsbereit bei den umfassenden experimentellen Arbeiten und der Erstellung der histologischen Präparate unterstützten.

Entscheidende Bereicherung erfuhr diese Arbeit auch durch Diskussionen mit meinem Vater Herrn Dr. med. Marius Herzig und meinem Bruder Herrn Cornelius Herzig, bei denen ich mich hiermit herzlich bedanke. Selbstverständlich gilt mein Dank auch der gesamten restlichen Familie, insbesondere meinen lieben Großeltern für liebevolle Unterstützung und vertrauensvolle Worte.

Nicht zuletzt gilt mein liebevoller Dank Thomas Finke für die entlastende, verständnisvolle und vor allem über alle Maßen geduldige und beruhigende Motivation.

10. ANHANG

10.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Catherine Herzig

Geburtsdatum: 10.10.1987

Geburtsort: Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

1993 – 1997 Turnvater Jahn Grundschule Berlin

1997 – 1999 Friedrich – Schiller – Schule Berlin

1999 – 2006 Oberschule am Elsengrund, 5. Gymnasium Berlin

07.06.2006 Abitur

Ausbildung

04/2007 – 03/2010 Ausbildung zur Operationstechnischen
Assistentin (OTA), Akademie für Gesundheit
Berlin-Brandenburg e.V.

03/2010 Erfolgreiches Examen (OTA)

04/2010 – 10/2010 Anstellung als OTA im DRK Klinikum
Berlin Köpenick

Studium

10/2010 – 03/2013 Studium der Humanmedizin
Philipps-Universität Marburg

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

19.03.2013 1. Staatsexamen, Ärztliche Vorprüfung

04/2013 – 04/2016 Studium der Humanmedizin
 Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
 Technische Universität Dresden

14.04.2016 2. Staatsexamen

04/2016–05/2017 Studium der Humanmedizin
 Charité Universitätsmedizin Berlin

09.05.2017 3. Staatsexamen

15.05.2017 Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

seit 09/2018 Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des
 Klinikum Dahme Spreewald, Achenbachkrankenhaus Königs
 Wusterhausen

Promotion

ab 04/2013 Doktorandin im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Viszeral-,
 Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus,
 Dresden

Sonstige Tätigkeiten

10/2012- 09/2018 Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe, Berlin
 Nebenberufliche Tätigkeit als OTA

Berlin, 31.08.2019

Catherine Herzig

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

10.2 Erklärung über die Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen der Dissertation

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation:

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: entfällt

- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Aktenzeichen der zuständigen Genehmigungsbehörde zum Vorhaben / zur Mitwirkung: Regierungspräsidium Dresden, Aufsichtsbehörde der Landesdirektion Sachsen, Aktenzeichen: 24-9168.11-1/2013-22

- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes

Aktenzeichen der zuständigen Genehmigungsbehörde zum Vorhaben / zur Mitwirkung: Regierungspräsidium Dresden, Aufsichtsbehörde der Landesdirektion Sachsen, Aktenzeichen: 558811.72/83/307

- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

Berlin, 31.08.2019

10.3 Eidesstattliche Erklärung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Optimierung eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen meiner unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Berlin, 31.08.2019

Catherine Herzig