



AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER  
LUDWIGS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

DIREKTOR: PROF. DR. THOMAS KIRCHNER

**Der Stammzellmarker LGR5 (Leucine-Rich Repeat G-protein  
Coupled Receptor 5) übernimmt keine tumortreibende Funktion in  
der kolorektalen Karzinogenese**

Dissertation zum

Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

KIRA BLUMRATH

aus Göttingen

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Jung
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Sebastian Kobold
	Priv. Doz. Dr. Helga Török
	Prof. Dr. Rainer Glaß
Tag der mündlichen Prüfung:	04.12.2014
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Andreas Jung, der mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand, viele freie Abende für mich opferte und mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. Jens Neumann, Herrn Dr. David Horst, Herrn Steffen Ormanns, Herrn Achim Schäffauer, Frau Schindler, Frau Sendelhofert und Frau Brand bedanken, die mir stets Ansprechpartner waren und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten.

Nicht zuletzt Dank an meine Eltern und Großeltern, die in vielfacher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

# Der Stammzellmarker LGR5 (*Leucine-Rich Repeat G-protein Coupled Receptor 5*) übernimmt keine tumortreibende Funktion in der kolorektalen Karzinogenese

## Inhaltsverzeichnis

Der Stammzellmarker LGR5 ( <i>Leucine-Rich Repeat G-protein Coupled Receptor 5</i> ) übernimmt keine tumortreibende Funktion in der kolorektalen Karzinogenese.....	1
<b>1 Die Metastasierung ist beim kolorektalen Karzinom therapielimitierend .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Die Tumorstammzellhypothese.....</b>	<b>3</b>
2.1 Tumorstammzellen verhalten sich plastisch und sind regulierbar .....	5
2.2 Entstehung von Tumorstammzellen und ihre Regulation .....	8
2.3 Tumorstammzellen sind verantwortlich für Metastasierung und Chemoresistenz .....	11
2.4 Ein aktivierter kanonischer WNT-Signalweg fördert Metastasierung und Chemoresistenz von Tumoren .....	14
<b>3 LGR5 und seine Rolle bei der Metastasierung von kolorektalen Karzinomen .....</b>	<b>18</b>
<b>4 Material &amp; Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1 Kits .....	21
4.2 Geräte .....	21
4.3 Methoden .....	22
4.3.1 RT-qPCR .....	22
4.3.2 Zelllinien.....	24
4.3.3 Zellkultur .....	25
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
5.1 Reduktion der LGR5-Expression durch RNA-Interferenz (RNAi) .....	32
5.2 Einfluss von LGR5 auf Markerprofil und Differenzierungstyp kolorektaler Zellen...	34
5.3 Einfluss von LGR5 auf die tumorigenen Fähigkeiten kolorektaler Tumorzellen .....	35
5.3.1 Einfluss von LGR5 auf die Migration kolorektaler Tumorzellen.....	36
5.3.2 Einfluss von LGR5 auf die Invasion kolorektaler Tumorzellen .....	37
5.3.3 Einfluss von LGR5 auf adhäsionsunabhängiges Wachstum kolorektaler Tumorzellen .....	37

<b>6 Diskussion</b> .....	<b>40</b>
6.1 LGR5 besitzt bei der kolorektalen Karzinogenese keine intrinsische funktionelle Rolle .....	41
6.2 Grenzen des Modells und Einordnung.....	43
6.3 Klinische Relevanz und Ausblick .....	46
<b>7 Anhang</b> .....	<b>49</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>52</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>53</b>
<b>10 Referenzen</b> .....	<b>54</b>

## Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

7-TM-R	7-Transmembran-Rezeptor
APC	adenomatous polyposis coli
ASCL2	achaete-scute complex homolog 2
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
CBC	crypt base columnar (cells)
c-Myc	c-Myelocytomatose
CRC	colorectal cancer
coCSC	colorectal cancer stem cell
CSC	cancer stem cell
DM1	Mertansin
E-Box	enhancer box
EMT	epithelio-mesenchymale Transformation
EZM	extrazelluläre Matrix
FAP	fibroblast activation protein, alpha
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
hTERT	Human Telomerase reverse transcriptase
KRAS	Kirstin rat sarcoma
LDL	Low density lipoprotein
LEF	Lymphoid enhancer factor
LGR5	leucine-rich repeat G-Protein coupled receptor 5
LRP	LDL receptor-related protein
MDR-1	multi drug resistance protein 1
MMP	Matrix-Metalloprotease
MT1-MMP	Membrane Type 1 Matrix-Metalloprotease
OLFM4	olfactomedin 4
p16	CDKN2A, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p53	tumor protein 53
RSPO1	R-Spondin 1
SNAI1	Snail homolog 1 (snail)
SNAI2	Snail homolog 2 (slug)
TCF	T cell factor
TIC	tumor initiating cells
TM	Transmembrane
Twist1	Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
Twist2	Twist basic helix-loop-helix transcription factor 2
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPA-R	urokinase-type plasminogen activator receptor
P-gp	permeability glycoprotein
T-DM1	Trastuzumab-Mertansin, Kadcycl <sup>®</sup>
WNT	wingless und Int-1
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

# EINLEITUNG

In Deutschland erkranken derzeit jährlich rund 31.000 Frauen und 38.000 Männer an einem kolorektalen Karzinom (CRC). Damit steht das CRC an zweiter Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei optimaler Therapie zwischen 40 und 60 % (RKI 2012).

## 1 Die Metastasierung ist beim kolorektalen Karzinom therapielimitierend

Obwohl das CRC zu einer der am besten erforschten Tumorentitäten zählt, wurden in den letzten Jahrzehnten nur unzureichende Fortschritte beim Therapieerfolg erreicht. Zwar konnten gezielte Antikörpertherapien in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika die 2-Jahres-Überlebensrate verbessern, die 5-Jahres-Überlebensrate blieb bisher jedoch unbeeinflusst (Bartlett 2012).

Als Therapie-limitierender Faktor gilt in erster Linie Metastasierung. Denn mehr als die Hälfte aller Patienten entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Metastasen, was ihre Prognose stark verschlechtert (Dietvorst 2013), da Lebermetastasen mit konsekutivem Leberversagen die führende Todesursache von Patienten mit CRC sind (McLoughlin 2006). Metastasen wachsen nach Initiation etwa 6 Jahre bis sie nachweisbar werden (D. Hölzel 2009). Daher entsteht das Bild einer erfolgreichen Remission, die tatsächlich jedoch nicht vorhanden ist. Der Prozess der Metastasierung lässt sich aus zellbiologischer Sicht in fünf Schritte untergliedern (Abb. 1): 1. Invasion und Intravasation, 2. Extravasation, 3. Migration, 4. Initiation von Zellwachstum, 5. Induktion von Angiogenese. Zellbiologisch kann die Kapazität für Metastasierung durch experimentelle Bestimmung von Migration, invasivem Wachstum und Transformation (*colony formation, anchorage independent growth*) der Tumorzellen bestimmt werden (Abb. 1).

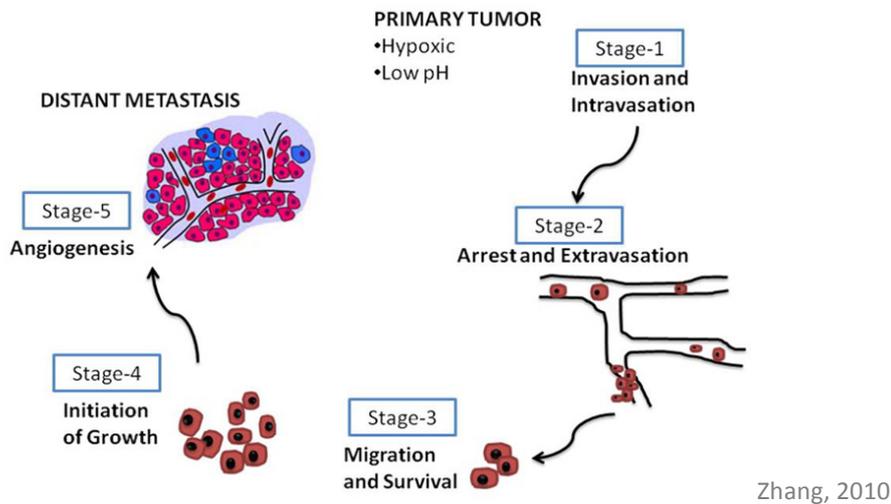
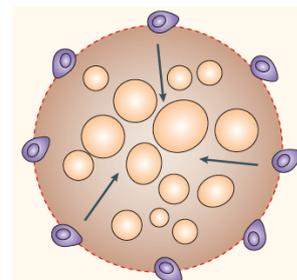


Abb. 1 - **Modell der Metastasierung** - Der Metastasierungsprozess kann in fünf Schritte (stage) unterteilt werden. Nach Durchbrechen der Basalmembran invadieren Zellen des Primärtumors das Stroma und gelangen durch Intravasation in Blut- oder Lymphgefäße. Die Hämolymphe transportiert diese Krebszellen zu entfernt liegenden Geweben, wo sie sich an das Endothel der versorgenden Gefäße anheften und via Extravasation in das Stroma des Zielorgans gelangen. Hier migrieren und invadieren die Tumorzellen erneut, sodass sich ruhende Mikrometastasen ausbilden können. Einige dieser Mikrometastasen sind letztlich in der Lage, ihr Zielgewebe zu kolonisieren, wodurch Makrometastasen entstehen (Zhang 2010).

Charakteristischerweise zeigen CRC und ihre Metastasen histologisch eine große Übereinstimmung. Einzelne Tumorzellen sind intratumoral jedoch deutlich heterogen. So finden sich sowohl im Primärtumor als auch in der Metastase hochinvasive, dedifferenzierte Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und niedriger Proliferationsaktivität vermehrt an der invasiven Front oder Invasionsfront der Tumoren, während im Zentrum des Tumors epithelial organisierte Tumorzellen dominieren, die einen hohen Proliferationsindex zeigen (Abb. 2). Korrespondierende Lebermetastasen zeigen ein analoges intratumoral heterogenes Wachstumsmuster (Brabletz 2001).

Abb. 2 - **Phänotypische Heterogenität in CRC und Metastasen.** Mesenchymal differenzierte Tumorzellen (lila) mit niedriger Proliferationsrate finden sich vermehrt an der invasiven Front, dem Übergang zwischen Tumor und normalem Gewebe. Zum Zentrum des Tumors hin nimmt die Zahl epithelial differenzierter proliferierender Zellen (hellbraun) zu. Die Regulation der Transdifferenzierung wird Zellen des Tumorstromas und der extrazellulären Matrix zugeschrieben (dunkelbraun) (Brabletz 2001, Brabletz 2005).



Brabletz, 2001/2005

Um diese intratumorale Heterogenität zu erklären, wurden verschiedene Modell-Systeme zur Tumorigenese entwickelt, von denen sich in der heutigen Onkologie zwei Modelle allgemein durchgesetzt haben, weil sie zum einen plausibel erscheinen, zum anderen experimentell abgesichert werden konnten. Bei diesen beiden Modellen handelt es sich um: (1) das klonale Evolutionsmodell, das bisweilen auch als stochastisches Evolutionsmodell bezeichnet wird und (2) die Tumorstammzell-Hypothese.

Das **klonale Evolutionsmodell** nimmt an, dass durch zufällige Mutationsprozesse Tumorzellen mit mutationsbedingtem Überlebensvorteil entstehen und in der Folge selektiv expandieren. Alle Zellen dieser dominanten Tumorzellpopulation sind dieser Hypothese zur Folge klonal, d.h.

- genetisch identische Klone, die über den Prozess der *multistep carcinogenesis* (Kinzler 1996) entstehen, sowie
- histologisch identisch.

Weiterhin können diese Tumorzellen

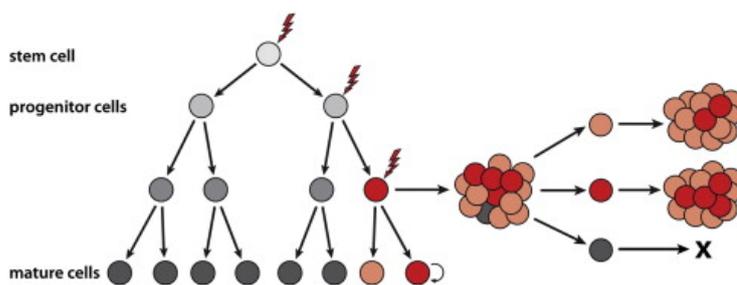
- gleichermaßen Sekundärtumoren und Metastasen induzieren (Abb. 3A).

## 2 Die Tumorstammzellhypothese

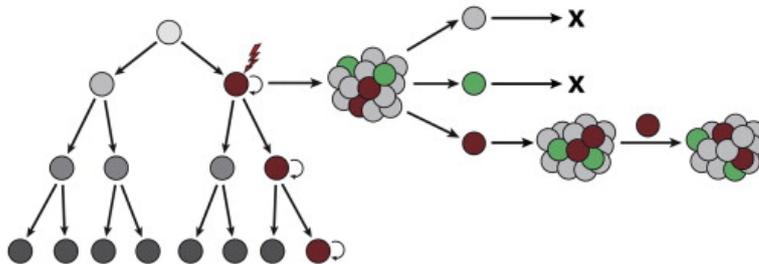
Das kanonische Modell ist jedoch ungeeignet, die bereits histomorphologisch offenkundige Heterogenität von Tumoren zu erklären, wie z.B. die Dedifferenzierung von Tumorzellen an der Invasionsfront von CRC. Ebenfalls zeigten *in vitro* Versuche, dass Tumorzellen grundsätzlich eine unterschiedliche intrinsische Kompetenz haben. So war lediglich eine von 10.000 Myelom-Zellen in der Lage, neue Kolonien zu generieren (Park 1971). Weiterhin wurde in *Xenograft*-Versuchen - also *in vivo* - gezeigt, dass nur eine Subpopulation von Tumorzellen neues Tumorwachstum initiieren kann (Bonnet 1997). Folglich zeigen Tumorzellen unterschiedliche Kompetenzen, was man nach dem klonalen Modell nicht erwarten würde. Die Tumorzellen, die in der Lage waren, Tumorwachstum zu initiieren, wurden als *TIC* (*tumor initiating cells*) bezeichnet. Da sich aus diesen wenigen Tumorzellen - analog zu

adulten Stammzellen - alle anderen Zelltypen eines heterogen differenzierten Tumors ableiteten, wurden diese Zellen außerdem als *Tumorstammzellen (cancer stem cell, CSC)* bezeichnet. Sie stehen an der Spitze der hierarchischen Organisation der Tumorzellen. Zum einen entstehen durch asymmetrische Teilung neue CSC (*self renewal*) (Dalerba 2007), zum anderen leiten sich alle unterschiedlich differenzierten Tumorzellen eines Tumors von diesen Zellen ab (*multipotency*) (Dalerba 2007) (Abb. 3 B). Die Gültigkeit dieses Modells wurde für etliche solider Tumore gezeigt, zu denen auch das CRC zählt (O'Brien 2007, Ricci-Vitiani 2007).

#### A Clonal evolution model



#### B Cancer stem cell model



Visvader, Lindeman, 2012

Abb. 3 - **Klonales Evolutionsmodell und Tumorstammzellmodell.** (A) Das Klonale Evolutionsmodell ist ein **nicht-hierarchisches** Modell, in dem akkumulierende Mutationen den Tumorzellen einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen. Eine Zelle (rot), die eine Reihe an Mutationen akkumuliert hat, repräsentiert einen dominanten Klon. Tumorzellen, die aus diesem Klon hervorgehen (rot und orange) haben eine ähnlich starke tumorigene Potenz. Andere Abkömmlinge (grau) können diese Tumorigenität verlieren oder sind weniger kompetent als andere Tumorzellen aufgrund der stochastischen Natur der Mutationen. (B) Das Tumorstammzellmodell nimmt eine **hierarchische** Organisation der Zellen an, bei der eine kleine Fraktion an Zellen die Fähigkeit zur Tumorigenese und zur Generierung von Heterogenität durch Differenzierung besitzt. Im gezeigten Beispiel ruft die Mutation einer Vorläuferzelle (braun) neue Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften hervor. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und produzieren durch unterschiedliche Transdifferenzierung viele unterschiedliche Zelltypen (grau und grün). Auf diese Weise tragen sie zur Tumorheterogenität bei (Visvader 2012). Hinzu kommt, dass differenzierte Zellen auch wieder zu Tumorzellen mit Eigenschaften von Tumorstammzellen werden können. Durch diese Variabilität gewinnt das System eine regulierbare Plastizität, die sich auch in Metastasen findet und somit hilft, die hohe intratumorale Heterogenität zu erklären. Das stochastische Modell zur Tumorentstehung und das Tumorstammzellmodell schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus, da CSC selber einer klonalen Evolution

unterliegen, aus der eine dominantere Zelle mit aggressiveren Eigenschaften hervorgehen kann (Anderson 2011, Clark 2000).

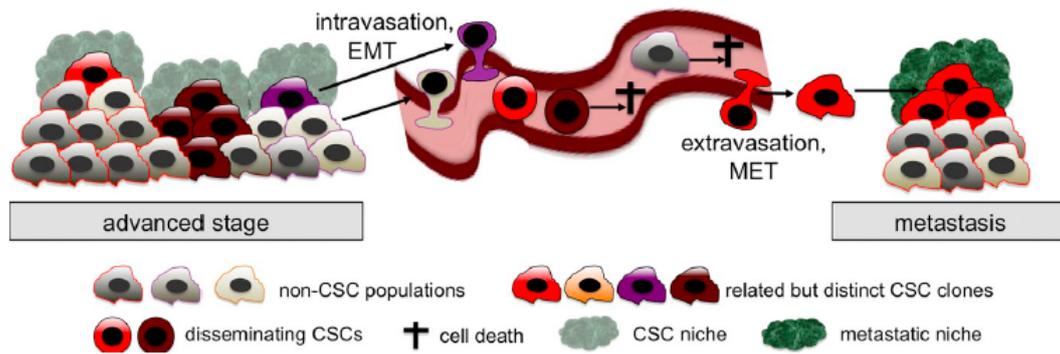
Tumorzellen entstehen aus transformierten adulte Stammzellen (Barker 2009) oder normalen Zellen mit Eigenschaften von CSC, die z.B. durch entzündliche Prozesse induziert werden können (Schwitalla 2013). Modellhaft ist somit die erste Tumorzelle die entsteht eine CSC. Da diese Zellen gleichzeitig die volle Kompetenz zur Metastasierung besitzen (Dieter 2011), bietet das Tumorstammzell-Modell gleichzeitig die Rationale, dass sich Metastasen bereits frühzeitig, z.B. schon auf der Stufe des Adenoms von Tumoren ableiten lassen (Klein 2009). Aus einer solchen Zelle kann sich am Ort der Metastase ein neuer Tumor bilden, der zwar Ähnlichkeiten zum Primarius aufweist - da sich Primarius und Metastasen aus denselben genetisch modifizierten Zellen entwickelt haben - zum anderen allerdings auch neue Eigenschaften entwickelt, weil die Entwicklung der Tumorzellen bzw. CSC in Primarius und Metastase parallel zueinander stattfindet (Gerlinger 2012).

## **2.1 Tumorstammzellen verhalten sich plastisch und sind regulierbar**

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die durch asymmetrische Teilung identische Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften generieren können (*self-renewal*). Die Mehrzahl der Abkömmlinge aus der Zellteilung differenziert nach einer anfänglichen Proliferation (*transiently amplifying unit*) zu spezialisierten Zellen des jeweiligen Gewebes. Diese Zellen sind durch eine limitierte Lebenszeit charakterisiert, die durch das Hayflick-Limit bestimmt wird. Diese lineare Abfolge in Entwicklung und Differenzierung ist Tumorstammzellen jedoch verloren gegangen. Vielmehr sind Tumorzellen durch eine hohe Plastizität gekennzeichnet. Die molekularen Mechanismen der Plastizität und vor allem Regulation dieser Plastizität sind noch nicht genau verstanden. Jedoch scheint dem Tumorstroma eine entscheidende Rolle zuzukommen. Denn in Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Faktoren der Stromazellen - wie z. B. HGF (*hepatocyte growth factor*) - in der Lage sind, differenzierte kolorektale Tumorzellen in solche mit Eigenschaften von CSC zu transformieren (Vermeulen 2010). Auf diese Weise finden sich kolorektale Tumorzellen in einem Kontinuum zwischen differenzierten Tumorzellen und Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Ein weiterer molekularer Mechanismus, der

zu phänotypischen Änderungen führt, ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). EMT bezeichnet einen primär physiologischen Prozess, der die Grundlage des Bewegungsprozesses der Gastrulation oder Neurulation bildet. Aus polaren epithelial differenzierten Zellen, die durch die Ausbildung von *zonulae adherentes* und somit der Expression von E-Cadherin gekennzeichnet sind, entstehen mobile mesenchymale Zellen, die kein E-Cadherin, dafür aber die mesenchymalen Markerproteine Vimentin und Fibronectin exprimieren. EMT induziert die Entstehung von Tumorzellen mit Eigenschaften von Tumorstammzellen (Mani 2008). Aus den mesenchymal differenzierten Zellen können sich jedoch auch wieder epitheliale Zellen bilden. Dieser Umkehrprozess wird als MET (mesenchymo-epitheliale Transition) bezeichnet. EMT und MET sind Prozesse, die sich in Tumoren parallel abspielen (van der Horst 2012, van der Pluijm 2011). Normale adulte Stammzellen können diese Hin-und Her-Regulation unter homöostatischen Bedingungen jedoch nicht ausführen, weil sie durch die Stammzellnische und somit nur hier in einem dedifferenzierten Zustand der *stemness* gehalten werden (Brabletz 2001, Tang 2012).

Dass EMT und MET an Progression und Metastasierung von Tumoren beteiligt sind (Kalluri 2009, Polyak 2009, van der Pluijm 2011) überrascht nicht, wenn man die für die Disseminierung von Tumorzellen notwendigen Schritte betrachtet (Abb. 4). Epitheliale Tumorzellen müssen übergangsweise eine mesenchymale Differenzierung annehmen, um Invasion, Migration sowie Intra- und Extravasation bewerkstelligen zu können. Diese mesenchymale, mobile Transdifferenzierung wird von Tumorzellen durch den Wechsel in das CSC-Kompartiment erreicht. Dadurch sind Tumorzellen im Stadium von CSC mit ihrer durch EMT ermöglichten Plastizität die Hauptursache für Metastasierung (Dieter 2011) und stellen somit das primäre Angriffsziel einer Tumorthherapie dar. Am Ort der Dissemination transdifferenzieren die Tumorzellen erneut, diesmal durch MET, wodurch ähnlich differenzierte Metastasen entstehen. (van der Pluijm 2011).



Bacelli, Trumpp 2012

Abb. 4 - **Plastizität kolorektaler Tumorzellen (CRC) als Voraussetzung für Metastasierung.** CRC sind in der Lage, mittels EMT ihre epitheliale Differenzierung passager zu verlieren, was ihnen die Dissemination ermöglicht. In diesem Stadium zeigen die Tumorzellen Eigenschaften von (Tumor-)Stammzellen (CSC). Damit verbunden sind Migration, Invasion und Intravasation in das Blutgefäßsystem. Dort sind sie in der Lage, dem Blutdruck standzuhalten und ohne Matrixkontakt (*anchorage independent growth*) zu überleben. Nach Extravasation entwickeln sich am Ort der Metastase nach MET zunächst Mikrometastasen, die wiederum epithelial differenziert sind und stark proliferieren können. Phänotypisch gleichen die Metastasen dem Primärtumor (Bacelli 2012).

Die Induktion von Stammzeleigenschaften in Tumorzellen kann während aller Stufen der Tumorprogression erfolgen und ist eng an die Mikroumgebung (*microenvironment*) des Tumors gekoppelt (van der Horst 2012). Die Beeinflussung der Tumorzellen durch die Mikroumgebung erfolgt durch mannigfaltige Einflüsse wie Hypoxie, Zytokine, inflammatorische Prozesse, Zellkontakt mit Stromazellen wie Myofibroblasten, Endothelzellen oder Interaktion mit der extrazellulären Matrix, wie Collagen, Fibronectin, Tenascion-C oder Laminin-5 $\gamma$ 2 u.v.a.m. Ebenfalls stellen auch Chemo- oder Radiotherapien eine Beeinflussung der Tumorzellen und der Mikroumgebung dar. So ist zum einen bekannt, das (1) Hypoxie *cancer stemness* in differenzierten Tumorzellen induziert (Li 2013) und (2) Zytokine/ Wachstumsfaktoren, wie der von Myofibroblasten sezernierte Wachstumsfaktor HGF (*hepatocyte growth factor*) die plastische Transformation differenzierter Tumorzellen zum CSC-Phänotyp fördern (Vermeulen 2010). Weiter können (3) proinflammatorische Zytokine wie NF- $\kappa$ B oder TNF- $\alpha$  *cancer stemness* und Angiogenese induzieren und so Tumorprogression und Metastasierung begünstigen (Li 2012). Schließlich transduzieren (4) Chemotherapeutika (etwa Platinverbindungen) differenzierte Tumorzellen in CSC mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Hu 2012). Im Allgemeinen scheint jede Form von Zellstress in der

Lage zu sein, eine Transformation von Tumorzellen in Zellen mit Eigenschaften von CSC zu induzieren (Zeindl-Eberhart 2014).

Wenn Tumorstammzellen essentiell für die Initiation von Tumoren sowie Metastasierung sind, dann sollten das plastische Kompartiment der CSC oder die induzierenden Signalwege für *cancer stemness* geeignete Ziele für rationale, zielgerichtete (*targeted*) Therapien sein.

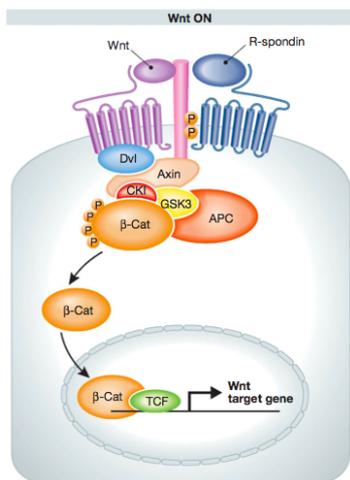
## 2.2 Entstehung von Tumorstammzellen und ihre Regulation

Nach dem heutigen Verständnis entstehen Tumoren durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen (Mutationen) oder irreversiblen epigenetischen Veränderungen (DNA-Methylierung) am Erbgut einer Zelle. Mutationen finden sich in Onkogenen (*gain of function*) und Tumorsuppressor- sowie *caretaker* Genen (*loss of function*), die in einer bestimmten, aber nicht genau festgelegten Folge und Kombination auftreten. Diese Zusammenhänge wurden im *multistep carcinogenesis model* beschrieben und zeigten, dass Krebs eine Erkrankung des Genoms ist (Vogelstein 1993).

Aufgrund der Kurzlebigkeit der Zellen in etlichen Kompartimenten wie Haut oder intestinalen Krypten ergibt sich, dass die Akkumulation mehrerer Mutationen über einen Zeitraum von ca. 60 Jahren nur in Zellen stattfinden kann, die eine entsprechend lange Lebenszeit aufweisen. Hierfür kommen in den meisten Organsystemen - wie auch dem intestinalen Kompartiment - ausschließlich adulte Stammzellen in Frage. So liegt im Darm die *turnover* Zeit aller anderen Zellen (*transit amplifying cells*: TA-Zellen, Schleim bildender Becherzellen, absorbierender Enterozyten sowie endokriner Zellen) in einem Zeitfenster zwischen vier und zehn Tagen, bevor die Zellen am apikalen Ende der Krypten oder Villi abgestoßen werden und durch Apoptose (Anoikis) sterben. Dabei führen Mutationen im Tumorsuppressorgen APC nur dann zur Ausbildung von Adenomen (Tumorinitiation), wenn die Alteration in den adulten Stammzellen des Dünndarms erfolgt (Barker 2009, Barker 2007). Andere normale Zellen des Darmkompartiments können nur dann Tumoren initiieren, wenn sie unter inflammatorischen Stress stehen, der z. B. durch NF- $\kappa$ B induziert werden kann (Schwitalla 2012). Diese Beobachtung bietet eine gute Erklärung, warum chronische

Entzündungen wie die Ulzerative Kolitis mit einer gesteigerten Tumorigenese assoziiert ist. Denn unter inflammatorischen Bedingungen werden die Zellen in einen stammzellähnlichen Phänotyp überführt, sodass sie funktionell adulten Stammzellen gleichen. Weiterhin bietet dieser Zusammenhang eine Basis für eine gute rationale Erklärungsmöglichkeit, warum Tumorzellen Eigenschaften von Stammzellen zeigen. Schließlich legen diese Zusammenhänge nahe, warum Mutationen in Signalwegen, welche adulte Stammzellen kontrollieren, gehäuft und als frühe Mutation gefunden werden (Pardal 2003). Denn erst dadurch gelingt es mutierten adulten Stammzellen Unabhängigkeit von der Stammzellnische zu erlangen, um sich in der Folge frei im Gewebe bewegen und aufhalten zu können. Speziell für das intestinale Kompartiment ist in diesem Kontext der WNT-Signalweg (Abb. 5) entscheidend, der sowohl in der embryonalen Entwicklung für die Gastrulation als auch im adulten Organismus für die Aufrechterhaltung des intestinalen Kompartiments essentiell ist (Korinek 1998).

Dabei kontrolliert der WNT-Signalweg Proliferation und Motilität und ist ebenfalls an der Regulation von Differenzierung (*cell fate*) beteiligt. In der Pathophysiologie kolorektaler Tumoren werden daher als Tumor-initiiierende Ereignisse insbesondere Mutationen des Tumorsuppressorgens APC und des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin gefunden. Dieser Zusammenhang zwischen Mutationen in zentralen regulatorischen Komponenten des Darms und der Ausbildung von Tumoren konnte zudem in einer Vielzahl präklinischer Mausmodelle verifiziert werden. Obwohl sich in Mäusen Adenome im Wesentlichen im Dünndarm entwickeln zeigt die Karzinogenese etliche funktionelle Parallelen zur Pathophysiologie menschlicher kolorektaler Karzinome. Daher gelten diese Mausmodelle als valide Systeme zur Modellierung humaner CRC (Fodde 2001).



Schuijers J, Clevers H (2012)

Abb. 5 - **Der WNT-Signalweg.** Die Aktivierung des WNT-Signalwegs erfolgt durch Bindung von WNT-Liganden an *frizzled* (*fz*) und LRP (LDL-Rezeptor-verwandtes Protein) Rezeptoren an der Zelloberfläche. In Abwesenheit von WNT, also einem inaktiven WNT-Signalweg, sorgt der APC-Proteinkomplex für die konstitutive Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, das konsekutiv ubiquitiniert wird, was als Abbausignal für das 28S-Proteasom-System dient. Bindet jedoch WNT an *frzl*/ LRP-Dimere, kommt es intrazellulär zur Aktivierung von *Dishevelled* (*Dvl*), das nach einem noch unverständenen Mechanismus einen aus multiplen Proteinen bestehenden Degradationskomplex inhibiert, der die funktionell wichtigen Proteine APC (*adenomatous polyposis coli*, *Axin*/*Axin2* und *GSK3 $\beta$*  (*Glykogensynthasekinase-3- $\beta$* ) enthält. Dies hat eine Reduktion der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zur Folge. Als Konsequenz wird  $\beta$ -Catenin vermindert ubiquitinyliert und abgebaut. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und schließlich auch im Nucleus, wo es gemeinsam mit HMG-Box-Proteinen der *TCF/LEF-1*-Familie und einer großen Zahl anderen Faktoren die Transkription von WNT-Zielgenen reguliert (Clevers 2006).

Die Bedeutung eines deregulierten WNT-Signalwegs für die Aufrechterhaltung der Tumorigenität wurde eindrucksvoll *in vitro* gezeigt, denn durch den Ausfall des  $\beta$ -Catenin Koaktivators TCF-4 (Abb. 5) in kolorektalen Tumorzellen wurden intestinale Differenzierung und terminaler Zellzyklus-Arrest induziert (Korinek 1998, Kuhnert 2004, Pinto 2003). Dieser Arrest wurde durch den Zellzyklus Inhibitor  $p21^{CIP1/Waf1}$  vermittelt (Sansom 2007, van de Wetering 2002) und konnte durch Überexpression des  $\beta$ -Catenin Zielgens c-Myc (He 1998) vollkommen rekonstituiert werden (Sansom 2007, van de Wetering 2002). Umgekehrt führt eine Aktivierung des onkogenen WNT-Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin (*gain of function*) zu einer konstitutiven Aktivierung des WNT-Signalwegs und in der Folge zu einer Hyperproliferation des Darmepithels (Harada 1999, Romagnolo 1999, Sansom 2004, Smits 1999). Schließlich findet man in spontanen CRC erwartungsgemäß in 60-80 % einen Verlust (*loss of heterozygosity* - LOH) und/oder eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC (Bienz 2000). Da APC Mutationen zudem oft die ersten genetischen Alterationen sind, die man in der humanen kolorektalen Karzinogenese fassen kann und diese für die neoplastische Transformation zum Adenom ausreichen, wird APC in seiner zentralen

und besonderen Rolle als *gatekeeper* der kolorektalen Karzinogenese bezeichnet (Kinzler 1990).

Zusammenfassend gelten Mutationen von  $\beta$ -Catenin oder APC und die daraus folgende Deregulation des WNT-Signalwegs als früher und ursächlicher Schritt der malignen Transformation beim CRC (Barker 2008, Kinzler 1996, Korinek 1997).

### **2.3 Tumorstammzellen sind verantwortlich für Metastasierung und Chemoresistenz**

In Anbetracht der wichtigen Rolle die  $\beta$ -Catenin bei der Regulation adulter Stammzellen übernimmt, ist es nicht verwunderlich, dass Tumorzellen im transienten CSC-Kompartiment durch nukleäres  $\beta$ -Catenin und somit einen konstitutiv aktivierten WNT-Signalweg charakterisiert sind (Vermeulen 2010). Insbesondere induziert die transkriptionelle Aktivierung von  $\beta$ -Catenin EMT und damit *cancer stemness* (Brembeck 2004, Sanchez-Tillo 2011) (vgl. Kap. 2.1). Der WNT-Signalweg reguliert in CRC alle wichtigen Komponenten der Tumorprogression: *cancer stemness* und damit Tumorinitiation, EMT, Metastasierung und schließlich Chemoresistenz, was in Tumoren anderer Organsysteme durch andere für diese Organsysteme entwicklungsphysiologisch wichtigen Signalwege wie dem Notch- oder Hedgehog-Signalweg reguliert wird. (Reya 2001) Kolorektale Tumorzellen mit diesen Eigenschaften können bereits immunohisto-morphologisch beobachtet werden, da sie durch die nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin charakterisiert sind. Denn die nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin ist ein Indikator für einen aktiven WNT-Signalweg (Brabletz 2001). Kolorektale Tumorzellen mit nukleärer Expression von  $\beta$ -Catenin finden sich vor allem an der Invasionsfront von CRC (Abb. 2). Hingegen finden sich Tumorzellen mit epithelialer Differenzierung - die durch membranöses  $\beta$ -Catenin charakterisiert ist - und gesteigerter Proliferation vermehrt in zentralen Arealen der CRC. Denn in diesen Zellen findet sich  $\beta$ -Catenin als integraler Bestandteil der Zonula adhaerens an der Membran und nicht mehr im Zellkern. Da die Tumorzellen im Zustand der CSC durch eine gesteigerte Invasion und Migration gekennzeichnet sind (Abb. 1) und dadurch verstärkt zur Metastasierung neigen, (Liu 2010) ist es nicht überraschend, dass die

Expression von nukleärem  $\beta$ -Catenin in den Zellen der Invasionsfront mit schlechtem Überleben korreliert (Ueno 2002, Wassermann 2009).

Da durch den WNT-Signalweg alle Eigenschaften maligner Progression (*cancer stemness*, EMT, Metastasierung, Chemoresistenz) reguliert werden, steht  $\beta$ -Catenin im Zentrum der malignen Progression von CRC (Abb. 6).

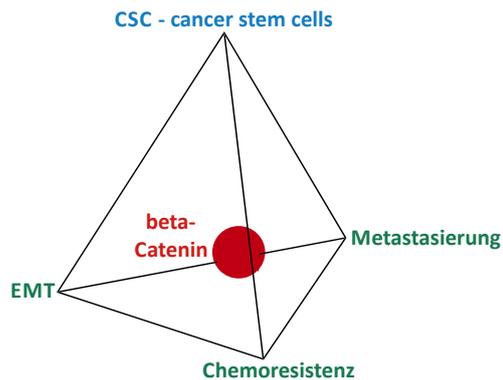


Abb. 6 - Der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg reguliert und kontrolliert die maligne Progression in CRC. Ein konstitutiv aktivierter kanonischer WNT/ $\beta$ -Catenin Signalweg reguliert über seinen Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin Eigenschaften der malignen Progression: EMT, *cancer stemness*, Metastasierung und Chemoresistenz werden durch transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin kontrolliert. Somit ist es nicht verwunderlich, dass durch Induktion einer der Eigenschaften maligner Tumorzellen (Eckpunkte des Tetraeders) gleichzeitig die anderen mit induziert werden. Somit sind diese Ausdruck der identischen durch nukleäre und transkriptionelle  $\beta$ -Catenin gekennzeichnete Aktivität von Tumorzellen.

Durch Induktion von EMT können sich Tumorzellen von der Haupttumormasse ablösen (Savagner 2001, Thiery 2002). In diesem Zustand zeigen diese Zellen eine hohe migratorische Kapazität (Mani 2008, Vermeulen 2010) und Eigenschaften von CSC, was sich bereits histochemisch durch die Expression spezifischer Tumorstammzellmarker nachweisen lässt (Horst 2009, Horst 2008, 2009, Horst 2009). Daher werden diese Tumorzellen als *migrating cancer stem cells* (MSC) bezeichnet (Brabletz 2005). Wichtig ist es, immer zu berücksichtigen, dass es sich bei den coCSC um keine feste Population an Zellen handelt. Vielmehr liegen diese Zellen als transiente Population plastischer Tumorzellen vor.

Neben der Induktion von Metastasierungsmechanismen vermittelt der deregulierte WNT-Signalweg auch Chemoresistenz, wobei diese grundsätzlich auf einer Vielzahl komplexer Mechanismen basiert. Wegen ihrer Assoziation mit dem aktivierten WNT-Signalweg ist Chemoresistenz erwartungsgemäß mit *cancer stemness* und EMT assoziiert (Abb. 6). So exprimieren Tumorstammzellen verstärkt ABC- (*ATP-binding cassette*) Transporter, welche Stoffwechselprodukte, Hormone, Toxine und

Medikamente transmembranär transportieren. Adulte Stammzellen sowie CSC exprimieren den MDR-1 (*multi drug resistance-1*, P-gp) Transporter, der eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika, wie Taxane, Anthracycline, Vinka-Alkaloide u.a.m. aus Zellen heraustransportiert (Juliano 1976). Erwartungsgemäß korreliert die Überexpression von MDR-1 mit schlechtem Therapieansprechen (O'Connor 2007). Schließlich ist MDR-1 auch ein  $\beta$ -Catenin Zielgen, (Yamada 2000) was erneut den Kreis mit *cancer stemness* schließt. CSC sind weiterhin in der Lage, einer durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose zu entgehen (Apoptoseevasion) (Fukuda 2006, Todaro 2007) und zeichnen sich durch eine niedrige Proliferationsrate aus, (Wassermann 2009) wodurch sie zusätzlich der schädigenden Wirkung der Chemotherapeutika entgehen können, denn diese greifen im Wesentlichen an der DNA-Replikation während der S-Phase des Zellzyklus an. Daher werden vor allem sich schnell teilende Zellen getroffen, die den Hauptanteil aller Tumorzellen ausmachen. Somit werden die langsam proliferierenden bis ruhenden CSC ge- bzw. verschont. Darüber hinaus können CSC zeitweise sogar in einen Zustand der Seneszenz wechseln, in dem die Proliferation praktisch vollständig eingestellt wird (Essers 2010, Tian 2011). Aufgrund der hohen Plastizität kolorektaler Tumorzellen entstehen aus dem Kompartiment der CSC praktisch in allen Fällen nach der Beendigung antineoplastischer Therapien erneut differenzierte und proliferierende Tumorzellen (Ricci-Vitiani 2008).

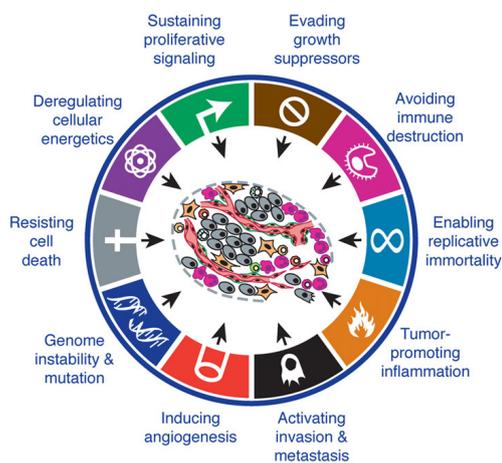
Durch diese Konstellation geht eine sich selbst perpetuierende Situation hervor, indem zum einen durch die Chemotherapie der CSC-Phänotyp induziert wird (Hu 2012) während gerade diese Zellen andererseits durch aktive - z. B. Pumpen wie MDR-1 - oder passive (geringe Teilungsrate, Seneszenz) Mechanismen vor der Wirkung der Chemotherapeutika geschützt werden. Plastizität von Tumorzellen ist somit die Basis für den unzufrieden stellenden Verlauf von Chemotherapien. Da der Hauptteil eines Tumors von proliferierenden und chemosensiblen differenzierten Tumorzellen gebildet wird, erreichen Standard-Chemotherapeutika initial eine Tumorregression, die sich damit bildgebend fassen lässt. Gleichzeitig wird der Anteil an Tumorzellen mit Eigenschaften von CSC durch die Chemotherapie erhöht. Diese kleine Population an Tumorzellen überlebt die applizierte Therapie und kann bildgebend nicht erkannt

werden. Erschwerend kommt hinzu, dass aus dieser Population durch Selektion resistente Varianten entstehen können, sodass nun hochresistente Klone expandieren.

Berücksichtigt man, wie diese pathophysiologischen Faktoren zusammen spielen, wird die Tragweite des plastischen Transformationsvermögens der Tumorzellen und Tumorstammzellen für Progression und Metastasierung von kolorektalen Tumoren deutlich.

## 2.4 Ein aktivierter kanonischer WNT-Signalweg fördert Metastasierung und Chemoresistenz von Tumoren

Wie bereits beschrieben sind die Zellen des CSC-Kompartiments im Tumor durch die nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin charakterisiert. Durch die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin werden viele - wenn nicht alle - *hallmarks of cancer* (Abb. 7) (Hanahan 2000, 2011) induziert. Auch in diesem funktionellen auf physiologischen Veränderungen basierenden Modell der Tumorigenese zeigt sich die fundamentale Bedeutung der Aktivierung des Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalwegs durch Mutation.



Hanahan 2011

Abb. 7 - *Hallmarks of cancer*. Alle malignen Tumoren weisen eine Reihe an funktionellen Eigenschaften (*hallmarks*) (Hanahan 2011) auf, die sie als solche charakterisieren. Umgekehrt lassen sich normale (kultivierte) Zellen durch die Aktivierung der *hallmarks* in Zellen umwandeln, die Eigenschaften maligner Transformation zeigen (Hahn 2002). In CRC wird eine Vielzahl der *hallmarks* durch die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin reguliert. Zu diesen *hallmarks* gehören: Invasion und Migration, Proliferation, unbegrenztes Teilungspotenzial, Apoptoseresistenz und überschießende Angiogenese.

Die Rolle und Zugehörigkeit einiger Gene, die durch aktiviertes  $\beta$ -Catenin reguliert werden und für die Funktion und Aufrechterhaltung der *hallmarks of cancer* (Abb. 7) essentiell sind, soll im Folgenden charakterisiert werden.

- (1) **EMT** Vimentin (Gilles 2003), Fibronektin (Gradl 1999), ZEB1 (Spaderna 2008)
- (2) **CSC** CD44 (Wielenga 1999), CD133 (Van der Flier 2007), CD166 (Van der Flier 2007), LGR5 (Barker 2007)
- (3) **Metastasierung** MMP7 (Brabletz 1999), uPA (Hiendlmeyer 2004), uPA-R (Mann 1999), Laminin-5 $\gamma$ 2 (Hlubek 2001), MT-MMP1 (Hlubek 2004), Tenascin-C (Beiter 2005)
- (4) **Angiogenese** VEGF (Easwaran 2003)
- (5) **Apoptoseresistenz** Survivin (Zhang 2001)
- (6) **Chemoresistenz** MDR-1 (Yamada 2000)
- (7) **Immortalität** hTERT (Hoffmeyer 2012, Jaitner 2012)

Auf einige besonders wichtige *hallmarks of cancer* (Hanahan 2000, 2011), die durch die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin reguliert werden, wird im Folgenden kurz eingegangen um die Bedeutung des deregulierten kanonischen WNT-Signalwegs zu untermauern:

Tumorzellen erreichen die **Invasion** in umliegendes Gewebe indem Tumorzell-assoziierte Proteasen durch perizelluläre Proteolyse die extrazelluläre Matrix (EZM) umbauen. Diese Proteolyse kann durch  $\beta$ -Catenin-gesteuerte Überexpression von Bestandteilen des uPA-Protease-Systems deutlich gesteigert werden. Tumorzellen sezernieren den Urokinase Typ Plasminogen Aktivator (uPA) (Hiendlmeyer 2004) und exprimieren gleichzeitig dessen Rezeptor (uPA-R) (Mann 1999). Deren Interaktion leitet den Abbau der EZM ein und aktiviert Matrix-Metalloproteasen (MMPs), unter ihnen die Matrix-Metalloprotease 7 (MMP-7) und die Membrane Typ I MMP (MT1-MMP). Beide Proteasen sind WNT-Zielgene (Brabletz 1999, Hlubek 2004). MMP-7 fördert zudem die Tumorproliferation und seine Überexpression gilt als negativer prognostischer Marker (Rawlings 2012). MMPs tragen zur Tumordinvasion bei, indem sie Proteine der EZM spalten, so die Zelladhäsion beeinträchtigen und mesenchymale Tumorzellen passieren lassen (Koshikawa 2000). Zusätzlich können Spaltprodukte dieser EZM-Proteine (z.B. Laminin-5 $\gamma$ 2) selbst

Zellmigration und –invasion fördern. Dabei erfordert die Spaltung für Laminin-5 $\gamma$ 2 die Aktivität der MT-MMP1, die, wie bereits erwähnt, ebenfalls ein Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist (Hlubek 2004). Bei dieser Spaltung entsteht die kleine Untereinheit von Laminin-5 $\gamma$ 2, die als bester bekannter Induktor für **Migration** (Pirila 2003) und als Marker für EMT (Zeisberg 2009) gilt. Da MT1-MMP und Laminin-5 $\gamma$ 2 beide  $\beta$ -Catenin-Zielgene sind und stark an der Invasionsfront kolorektaler Karzinome exprimiert werden, wird die Invasivität kolorektaler Tumorzellen bei Aktivität von  $\beta$ -Catenin durch die konzertierte Expression beider Komponenten besonders stark erhöht, was eine zusätzliche Erklärung für die Korrelation von EMT mit schlechter Prognose sein kann (Ueno 2002).

Eine unkontrollierte **Proliferation** wird Tumorzellen durch Umgehen der Zellzyklusinhibition und Checkpoints des Zellzyklus ermöglicht. Die Überexpression der Zellzyklus-Promotoren und WNT-Zielgene c-Myc (He 1998) und CyclinD1 (Shtutman 1999, Tetsu 1999) erlaubt wachstumsfaktorunabhängige Teilung. Jedoch ist dieser Zusammenhang *in vivo* weniger klar, denn Tumorzellen der Invasionsfront mit nukleärem  $\beta$ -Catenin sind durch eine geringe Zellteilung gekennzeichnet (Brabletz 2001). Gleichzeitig exprimieren diese Zellen erhöhte Mengen des Zellzyklusinhibitors p16<sup>INK4a</sup> (Jung 2001), welches wiederum ein Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist (Wassermann 2009). Welche Rolle  $\beta$ -Catenin in den Zellen übernimmt, scheint somit sehr vom Kontext der Tumorzelle mit dem sie umgebenden Stroma abzuhängen (Liotta 2001).

Die maligne **Transformation** von normaler Mukosa zum Karzinom erfolgt stufenweise und hängt mit der zunehmenden Fähigkeit zur **Apoptoseinhibition** zusammen (Bedi 1995). Survivin, ein Apoptose-inhibierender Faktor (IAP) behindert die Einleitung der Apoptose. Survivin ist ein Zielgen des WNT-Signalwegs (Zhang 2001) und liegt im Normalgewebe lediglich in adulten Stammzellen vor. In CRC wird es jedoch hochgradig exprimiert (Kim 2003).

Sauerstoff kann in Geweben etwa 100  $\mu$ m weit diffundieren. Ohne eine begleitende **Angiogenese**, die Nähr- und Sauerstoffversorgung der fortwährend wachsenden Masse an Tumorzellen sicherstellt, ist kein nachhaltiges Tumorwachstum möglich. Der wichtigste Auslöser für Angiogenese ist Hypoxie, welche aufgrund der Diffusionsgrenze zwangsläufig bei Tumorwachstum auftritt. Auf der anderen Seite induziert Hypoxie

eine Transformation in CSC (Zeindl-Eberhart 2014), die mit verstärkter Migration, Invasivität und EMT gekoppelt ist, sodass sich Tumorzellen aus diesem für sie ungünstigen Milieu leicht entfernen können (Li 2013, Mizukami 2004). Somit wird durch die Expansion des Tumors gleichzeitig seine Kapazität für Metastasierung gesteigert und insbesondere in Kombination mit aktiviertem KRAS die transkriptionelle Aktivierung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der die neoplastische Gefäßneubildung fördert (Zhang 2001).

Bei jeder Replikation kommt es zu einer Verkürzung der Telomere am 3'-Ende der Chromosomen (Blasco 2002). Unterhalb einer kritischen Länge geht dadurch der *telomeric loop* verloren, sodass die freien ungeschützten Chromosomenenden aufgrund der Nachbarschaft insbesondere während einer Mitose leicht mit anderen Chromosomen verkleben, um dann während einer nachfolgenden Mitose zu brechen (*bridge fusion breakage*). Normale Zellen treten dann in einen Zustand der Seneszenz ein (Replikations-induzierte Seneszenz) oder sterben durch Apoptose (Heidinger 2012). Durch diesen Mechanismus ist die mögliche Anzahl an Zellteilungen in adulten Zellen auf 40 - 60 beschränkt. Diese Obergrenze wird als Hayflick-Grenze bezeichnet (Hayflick 1961). Die Menge dieser natürlicher Teilungen variiert von Spezies zu Spezies und bestimmt so ihre Lebenserwartung (Heidinger 2012). Interessanterweise können Epithelzellen im Unterschied zu Fibroblasten die anfängliche Seneszenz durchbrechen und sich wieder teilen. Dabei entstehen erhebliche Umbauten des Genoms, die in den Zustand der Aneuploidie münden. In diesem Zustand der Instabilität würden alle Zellen auf kurz oder lang sterben. Jedoch reaktivieren einigen dieser Zellen die Expression der hTERT (*Human Telomerase reverse transcriptase*), die normalerweise nur in embryonalen oder adulten Stammzellen zu finden ist. Hierdurch sind die Epithelzellen in der Lage, die Telomere wieder zu verlängern, sodass in der Folge das veränderte Genom stabilisiert wird (Romanov 2001). Diese Zusammenhänge bieten eine gute Erklärungsmöglichkeit, warum beim Menschen der Anteil der von Epithelzellen abgeleiteten Karzinome wesentlich höher ist als die Frequenz der Sarkome, die sich von fibroblastären Zellen ableiten. Denn in Fibroblasten ist die durch Replikation induzierte Seneszenz stabil. Interessanterweise ist hTERT ein  $\beta$ -Catenin Zielgen (Hoffmeyer 2012, Jaitner 2012), sodass die Immortalisierung von kolorektalen Zellen bereits sehr früh erfolgen kann.

Zusammengefasst kontrolliert der kanonische WNT-Signalweg die entscheidenden Schritte der malignen Progression der kolorektalen Karzinogenese über die Deregulation des Onkogens  $\beta$ -Catenin. Durch die Vermittlung einer Vielzahl der *hallmarks of cancer* wird  $\beta$ -Catenin zur treibenden Kraft (*driving force*) der kolorektalen Karzinogenese (Scheel 2010). Vor allem können sich Tumorzellen mit aktivem  $\beta$ -Catenin-Signalweg einer Chemotherapie entziehen, sodass sich aus diesem Residuum erneut Tumoren ausbilden können (Rezidiv).

Um in Zukunft wirksamere Therapiestrategien zu entwickeln, welche nicht nur die Masse an differenzierten Tumorzellen, sondern im Sinne eines nachhaltigen Therapieansatzes auch die den Tumor unterhaltenden CSC miteinbeziehen, ist es notwendig, CSC ebenfalls durch die Therapien zu treffen. Dies könnte zum einen durch das Erkennen von Strukturen auf den Oberflächen der CSC - den Tumorstammzellmarkern - erfolgen. Ideal wäre jedoch ein Marker, der nicht nur die CSC identifiziert, sondern selbst eine funktionelle Rolle in der Biologie der CSC übernimmt, da man sich von einer solchen Therapie einen größeren Effekt versprechen könnte. Besonders interessant wäre hier die Option, auf diese Weise bereits den differenzierten Tumorzellen den Eintritt in das Kompartiment der Tumorstammzellen zu verstellen, welches ein kaum vulnerables Reservoir und damit einen *escape* Mechanismus für Tumorzellen darstellt. Somit stellt sich die Frage, welcher Marker der CSC eine solche essentielle Rolle übernehmen könnte.

### **3 LGR5 und seine Rolle bei der Metastasierung von kolorektalen Karzinomen**

Da Tumorstammzellen aus adulten Stammzellen entstehen, ist es naheliegend anzunehmen, dass Tumorstammzellen Eigenschaften von adulten Stammzellen bewahrt haben. Daher bietet es sich an, Marker, die organspezifische adulte Stammzellen charakterisieren und vor allem für die Tumorbilogie eine entscheidende Rolle einnehmen, auf ihre Bedeutung und Funktion für die Regulation von CSC hin zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit zur Selektion geeigneter Marker ist es, sich auf Komponenten zu konzentrieren, die durch den WNT-Signalweg induziert werden, weil dieser im kolorektalen Kompartiment mit der Induktion von CSC verbunden ist

(Vermeulen 2010). Dadurch wird sichergestellt, dass kolorektale CSC getroffen werden. Hier bieten sich verschiedene Marker an, wie CD44 (Du 2008), CD133 (Catalano 2012), ASCL2 (van der Flier 2009) oder OLFM4 (van der Flier 2009). Eine Ausnahme bildet Bmi1 (Jiang 2009), das kein Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist.

Ein weiterer interessanter Marker wurde durch Expressionsanalysen intestinaler Neoplasien im Menschen, der Maus (genetisch modifizierte Tiere) und Zelllinien identifiziert: LGR5 (*Leucin rich motif G-protein coupled receptor-5*) (Van der Flier 2007). LGR5 ist Mitglied der *seven transmembrane spanning* Familie und wurde als Marker adulter intestinaler Stammzellen in den *crypt base columnar cells* identifiziert. Diese LGR5-positiven Zellen sind als Stammzellen in der Lage, *in vitro* alle Zellen der Krypten-Villus Einheit auszubilden, was sich durch *lineage tracing* Experimente nachweisen ließ (Barker 2007). LGR5 ist ein transkriptionelles Zielgen von  $\beta$ -Catenin. Umgekehrt moduliert LGR5 selbst die Wirkung der WNT-Signaltransduktion, indem es durch Bindung an R-Spondine 1 bis 4 (RSPO1-4) die Aktivität des WNT-Signalwegs potenzieren kann (Carmon 2011), wodurch eine *feed forward* Stimulation entsteht. Weiterhin bindet LGR5 Dickkopf-1 (DKK1), einen Inhibitor des kanonischen WNT-Signalwegs, was einer weiteren Aktivierung entspricht (Pinto 2003).

Viele kolorektale Tumorzelllinien und alle sporadischen Kolonadenome überexprimieren LGR5 (Uchida 2010). Nur LGR5-positive Tumorzellen können *in vitro* Sphäroide ausbilden (Kemper 2012), was als ein Merkmal (Goldstandard) von *cancer stemness* gilt. (Auch LGR5 negative Tumorzellen bilden schließlich Sphäroide aus, allerdings erst sehr viel später, weil sich aufgrund der Plastizität aus den differenzierten LGR5 negativen Tumorzellen erst Zellen mit Eigenschaften von CSC ausbilden, die LGR5-positiv sind und dann in der Folge Sphäroide ausbilden können.) Im Mausmodell führt die Überexpression des LGR5-Liganden RSPO1 zu einer generalisierten Vergrößerung des Durchmessers sowie zu einer Gewichtsverdopplung des Dünn- und Dickdarms, was durch Hyperproliferation von Einzelkrypten hervorgerufen wird. Ebenfalls zeigen die Zellen des betroffenen intestinalen Kompartiments eine verstärkte nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin. (Kim 2005). Die Expression von LGR5 wurde bisher in humanen kolorektalen Präneoplasien (Becker 2008) und Karzinomen untersucht. Hier zeigte sich erwartungsgemäß eine Korrelation mit schlechtem Überleben (Saigusa 2013, Wu 2012). Bei der Interpretation dieser

Ergebnisse ist jedoch ein gewisses Maß an Skepsis an den Tag zu legen. Denn LGR5 mRNA und Protein werden nur in geringen Mengen exprimiert (Barker 2008), sodass ein *in situ* Nachweis prinzipiell sehr schwer ist. Zum anderen gibt es bis heute keine verlässlichen, LGR5-spezifischen und damit geeigneten Antikörper, um die Expression von LGR5 *in situ* zu messen. Somit ist eigentlich unklar, was in Arbeiten, die auf einem *in situ* Nachweis basieren, gemessen wurde. Daher wurde als Surrogatmarker ein anderer vermeintlicher Stammzellmarker, OLFM4 (Olfactomedin-4) für *in situ* Arbeiten eingesetzt, weil dieses Protein parallel zu LGR5 exprimiert zu werden scheint (Grover 2010).

Somit ist bereits bekannt, dass das  $\beta$ -Catenin-Zielgen LGR5 nicht nur die Stammzellnische im Darm reguliert, sondern auch eine funktionelle Rolle in der Regulation migrierender Tumorstammzellen übernehmen kann, die für Metastasierung und Tumorprogression verantwortlich sind. Hingegen ist nicht klar, ob LGR5 lediglich in Kombination mit R-Spondin eine funktionelle Rolle übernimmt oder ob dies bereits intrinsisch durch LGR5 erfolgen kann und welche Aufgaben es im Kontext der Metastasierung bzw. Induktion der Tumor *stemness* übernimmt.

Um die Rolle von LGR5 für Eigenschaften der Metastasierung kolorektaler Tumorzellen zu untersuchen, wurde in LGR5-exprimierenden kolorektalen Zelllinien mithilfe von RNA-Interferenz (RNAi) ein funktioneller *knockdown* von LGR5 durchgeführt. Die dabei entstehenden Subklone wurden auf Änderungen der Eigenschaften Migration, Invasion und Transformation untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss von LGR5 auf *cancer stemness* untersucht, indem Expressions-Änderungen der putativen CSC-Marker ASCL2, OLFM4, CD44, CD133 und CD166 sowie der EMT-Marker E-Cadherin, Vimentin und ZEB1 in den Zelllinien mit LGR5 spezifischem *knockdown* in einen Vergleich zu einem Kontroll-*knockdown* von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) analysiert wurde. Da sich im Verlauf der Experimente zeigte, dass das in diesem experimentellem Ansatz für die Zellkulturexperimente eingesetzte fötale Kälberserum kein R-Spondin enthielt (Walker 2011), lag eine Situation ohne intrinsische LGR5/RSPO Aktivierung vor, in der die Wirkung des nicht aktivierten LGR5 Rezeptors untersucht werden konnte.

## 4 Material & Methoden

### 4.1 Kits

#### RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

##### **Kit-Inhalt – Katalognummer 74104**

- RNeasy Mini Spin Columns
- Collection Tubes (1.5 ml)
- Collection Tubes (2.0 ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-Free Water

##### **Anwendung**

RNeasy Kits wurden entsprechend den Handbuch-Anleitungen (Anhang I) eingesetzt.

#### RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase Kit (Fermentas)

##### **Kit-Inhalt – Katalognummer K1651**

- 5x RT Puffer
- Ribolock, RNase Inhibitor
- dNTP Mix, 10mM
- Random Hexamer Primer
- RevertAid Reverse Transkriptase
- DEPC-behandeltes Wasser

##### **Anwendung**

RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase-Kit (Fermentas) dient der reversen Transkription (Umschreibung) von RNA in cDNA. Hierfür wurde das von Fermentas empfohlene Protokoll (Anhang II) eingesetzt.

### 4.2 Geräte

#### QIAGEN – QIAcube

Sämtliche RNA-Extraktionen wurden mithilfe des QIAcube durchgeführt. Der QIAcube ist ein Roboter, der die im RNeasy-Handbuch beschriebenen Reinigungsschritte

automatisch in Niedrigdurchsatz-Verfahren durchführt (automatisierte Methode nach den von QIAGEN veröffentlichten Vorschriften, s. 4.1 RNeasy Kit).

### **PEQLAB – Nanodrop**

Alle RNA-Konzentrationen wurden anhand der PEQLAB–Nanodrop-Technologie (Thermo Fisher Scientific) vermessen und aus den Absorptionswerten  $OD_{260}$ ,  $OD_{280}$  und  $OD_{320}$  (Extinktion bei Wellenlängen von  $\lambda=260\text{nm}$ ,  $\lambda=280\text{nm}$  und  $\lambda=320\text{nm}$ ) die Konzentration ( $OD_{260}$ ) auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes (molarer Extinktionskoeffizient:  $\varepsilon = 40 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ ) und die Reinheit ( $OD_{280}$ ,  $OD_{320}$ ) bestimmt.

### **MBS – PCR Cyclers**

Alle PCR-Läufe wurden mit Hybaid MBS Satellite 0.2G Gradient Thermal Cyclern (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

### **Roche Applied Science – Light Cyclers 480**

qPCRs wurden unter Einsatz eines LightCycler 480 (Roche Applied Biosystems, Penzberg) durchgeführt. Die Bedienung des Cyclers erfolgte nach den im Handbuch vorgegebenen Richtlinien.

## **4.3 Methoden**

Alle Assays und Messungen wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander und in Replikaten durchgeführt.

### **4.3.1 RT-qPCR**

Die RNA-Expression wurde mithilfe von RT-qPCR quantifiziert. In einem ersten Schritt wurden dazu  $5 \mu\text{g}$  gesamt RNA mittels des RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase Kit (Fermentas, s. 4.1) in Kombination mit *random hexamer primer* (Fermentas, St. Leon, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte exakt

nach den Angaben des Herstellers. Eine optionale Präinkubation wurde bei 65 °C für 5 Minuten durchgeführt und das Reaktionsgemisch anschließend auf Eis abgekühlt.

In einem zweiten Schritt wurde die cDNA anhand mittels quantitativer PCR gemessen. Dazu wurden ProbesMaster Kits (Roche Applied Biosystems, Mannheim, Deutschland) zusammen mit qPCR-Wasser (Anhang III) und Gen-spezifischen Primern sowie zugehörigen Sonden (Tab. 1) eingesetzt. Alle qPCR Ansätze erfolgten in Triplikaten.

NAME	PRIMER-SEQUENZEN	NAME	PRIMER-SEQUENZEN
HPRT	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CD44	GGTCCCATAACCACTCATGGA
	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT		TCCTTATAGGACCAGAGGTTGTG
GADPH	AGCCACATCGCTCAGACAC	CD133	TCCACAGAAATTTACCTACATTGG
	GCCCAATACGACCAAATCC		CAGCAGAGAGCAGATGACCA
β-Actin	CCAACCGGAGAAGATGA	CD166	GGCAGTGAAGCGTCATAA
	CCAGAGGCGTACAGGGATAG		CATTCTTTCAGGGAAATGA
YWHAZ	GATCCCAATGCTTCAACAAG	E-Cadherin	CCCGGACAACGTTTATTAC
	TGCTTGTGTGACTGATCGAC		GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC
LGR5	AATCCCCTGCCAGTCTC	Vimentin	TACAGGAAGCTGCTGGAAGG
	CCCTTGGGAATGTATGTCAGA		ACCAGAGGGAGTGAATCCAG
ASCL2	GCACCAACACTTGAGATTTT	ZEB1	GGGAGGAGCAGTAAAAGAGA
	AATGGATTCTCTGTGCCCTTAG		TTTCTTGCCCTTCCTTTCTG
OLFM4	ATCAAAACACCCCTGTCGTC		
	GCTGATGTTACCACACCAC		

Tab. 1 - **Primersequenzen für die quantitative PCR (qPCR)**. Für die Untersuchungen wurden die vier Referenzgene β-Actin, GAPDH (Glyzerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), HPRT (Hypoxanthin-phospho-ribosyltransferase) und Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, ξ-Polypeptide (YWHAZ) eingesetzt. Analysiert wurde außerdem die Expression der Tumorstammzellmarker acaete scute like protein - 2 (ASCL2), Leucin-rich-G-protein coupled receptor (LGR5) und Olfactomedin 4 (OLFM4).

## 4.3.2 Zelllinien

### Kolorektale Zelllinien

Für die Messungen wurden sieben kultivierte kolorektale Zelllinien (CaCo2, Colo320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS174T, RKO, SW403, SW480, SW680, SW1222 und T84) eingesetzt (Tab. 2).

ZELLINIE	BEZUGSQUELLE	HERKUNFT UND EIGENSCHAFTEN
CaCo2	DSMZ	Adenokarzinoms des Kolons, 72-jähriger kaukasischer Mann (1974)
COLO320	DSMZ	moderat differenziertes Adenokarzinom des Sigmas, 55-jährige kaukasische Frau (1977), Produktion von Serotonin und Epinephrin
<b>DLD1</b>	DMSZ	kolorektales Adenokarzinom, epitheloide adhärente Zellen, Wachstum als Monolayer; Verdoppelungszeit: 48h
HCT116	LGC Standards	Primarius eines Kolonkarzinoms eines erwachsenen Mannes, RAS-Mutation in Codon 13, tumorigen in Nacktmäusen
HT29	DSMZ	Adenokarzinom des Kolons, 44-jährige kaukasische Frau (1964), nach Heterotransplantation Bildung gut differenzierter G1-Tumore
<b>LoVo</b>	DMSZ	Lymphknoten-Metastase eines Adenokarzinoms des Kolons; 56-jähriger, kaukasischer Mann (1972); CEA-Produktion
LS174T	LGC Standards	moderat- bis gut differenziertes Adenokarzinom des Kolons (Duke B), 58-jährige Frau, CEA-, Myc- und Ras-Produktion
RKO	LGC Standards	aus einem schlecht differenzierten Adenokarzinoms des Kolons
<b>SW403</b>	DMSZ	kolorektales Adenokarzinom (Grad III); 51-jährige kaukasische Frau; CEA-Produktion; tumorigene Wirkung in Nacktmäusen
SW480	DSMZ	Adenokarzinom des Kolons (Grad 4 Duke B), 50-jähriger kaukasischer Mann
SW620	LGC Standards	Lymphknoten, 51-jähriger kaukasischer Mann, CEA-Produktion, stark tumorigen in Nacktmäusen
SW122	ECACC	moderat bis gut differenziertes Adenokarzinom des Kolons (Duke C), tumorigen in Nacktmäusen
<b>T84</b>	ATCC	Lungenmetastase eines kolorektalen Karzinoms; 72-jähriger Mann; subkutane Impfung des Tumorgewebes in Nacktmäuse, anschließend serielle Transplantation; nach 23 Passagen in athymen Mäusen: Etablierung der Zelllinie T84; Wachstum in Monolayern mit Tight Junctions und Desmosomen

Tab. 2 - **Charakteristika der eingesetzten kolorektalen Tumorzelllinien:** Zusammenfassung der Eigenschaften der eingesetzten kolorektalen Tumorzelllinien (ATCC 2014, DSMZ , PHE 2014). Die in dieser Arbeit für weiterführende Experimente eingesetzten Zelllinien sind fett gedruckt.

Alle Zelllinien wurden in DMEM (Biochrom AG, Berlin) mit 7,5 % (v/v) FCS (Biochrom AG, Berlin) kultiviert.

### 4.3.3 Zellkultur

Alle Messungen der LGR5-Expression sowie die Kontrolle des Transfektionserfolges - jeweils an Tag 4 und 18 nach Selektion - wurden bei einer Zelldichte von 60 % durchgeführt, um die Zellen in einem vergleichbaren physiologischen Zustand zu halten, da sich auch die Expression der Referenzgene zwischen dicht- und dünn wachsenden Zellen unterschiedlich verhalten kann.

Die Ausprägung von Migration, Invasion und adhäsionsunabhängigem Wachstum wurde in zwei unabhängigen Experimenten gemessen und in jedem dieser biologischen Replikate in Tetraplikaten angesetzt. In den Experimenten wurden dabei jeweils die RNA Werte der parentalen Zellen mit denen der shRNA transduzierten Zelllinien shEGFP sowie den für LGR5 spezifischen shRNAs shLGR5-2 (shLGR5-2) und shLGR5-5 (shLGR5-5) transduzierten Varianten verglichen.

Da die Zelllinie SW403 sehr langsam wuchs, wurde diese lediglich in Migrationsversuche eingesetzt. Für alle anderen Experimente war diese Zelllinie ungeeignet, weil der Effekt des LGR5 *knockdowns* aufgrund der langen Wartezeiten verloren gegangen wäre.

Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der eingesetzten Zelllinien unterschieden sich die Ablese- bzw. Auswertungszeiten zwischen den verschiedenen verwendeten Zelllinien erheblich voneinander. Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden daher relative Änderungen betrachtet, wobei mit shEGFP erzielte Effekte als Standard angenommen und daher auf den Wert 1 oder 100 % gesetzt wurden.

#### Transduktion, Selektion

Um möglichst hohe Effekte in den Experimenten erzielen zu können, wurden Zelllinien mit einer hohen endogenen Expression an LGR5 verwendet. Daher wurde zunächst die endogene LGR5-Expression in 13 kultivierten kolorektalen Zelllinien (Tab. 2) mittels RT-qPCR gemessen (Abb. 14, 5.1). Weiterhin wurde bei der Auswahl der Zellen darauf Wert gelegt, dass jeweils eine aus den bekannten molekularen Subtypen MSI-H (*high grade microsatellite instable*), MSS (*microsatellite stable*) und CIMP (*CpG island*

*methylator phenotype*) stammen sollte. Insgesamt wurden vier Zelllinien mit ausreichend hoher endogener LGR5-Expression ausgewählt.

Um den Effekt von LGR5 zu untersuchen wurde die LGR5 Expression in den ausgewählten Zellen mithilfe von RNA-Interferenz (RNAi) reduziert. Dazu wurden infektiöse lentivirale Partikel (Sigma, MISSION) eingesetzt, weil diese eine hocheffiziente Methode darstellen, Nukleinsäuren in die schwer zu transfizierenden kolorektalen Zelllinien zu bringen. Die Transduktion wurde streng nach Protokoll von Sigma-Aldrich durchgeführt (MISSION® Lentiviral Transduction Particles, Sigma-Aldrich).

Um wiederholte Austestungen verschiedener shRNA-Sequenzen auf ihre maximale *knockdown* Effizienz zu vermeiden, wurden initial bereits fünf unterschiedliche shRNAs die RNA-Interferenz eingesetzt (Tab. 3).

shRNA	Klon ID	Sequenz-Typ	Sequenz
sh1	TRCN0000011585	Ziel: Haarnadel: Forward: Reverse:	CCATCCAATTTGTTGGGAGAT CCGGCCATCCAATTTGTTGGGAGATCTCGAGATCTCCAACAAATTGGATGGTTTTT CCGGCCATCCAATTTGTTGGGAGATCTCGAGATCTCCAACAAATTGGATGGTTTTTG AATTCAAAAACCATCCAATTTGTTGGGAGATCTCGAGATCTCCAACAAATTGGATGG
shLGR5-2	TRCN0000011586	Ziel: Haarnadel: Forward: Reverse:	CCATAGCAGTTCTGGCACTTA CCGGCCATAGCAGTTCTGGCACTTACTCGAGTAAGTGCCAGAAGCTGCTATG-TTTTT CCGGCCATAGCAGTTCTGGCACTTACTCGAGTAAGTGCCAGAAGCTGCTATGTTTTTG AATTCAAAAACCATAGCAGTTCTGGCACTTACTCGAGTAAGTGCCAGAAGCTGCTATGG
sh3	TRCN0000011587	Ziel: Haarnadel: Forward: Reverse:	CCGTCTGCAATCAGTTACCTA CCGGCCGTCTGCAATCAGTTACCTACTCGAGTAGGTAAGTATTGCAGACGGTTTTT CCGGCCGTCTGCAATCAGTTACCTACTCGAGTAGGTAAGTATTGCAGACGGTTTTTG AATTCAAAAACCGTCTGCAATCAGTTACCTACTCGAGTAGGTAAGTATTGCAGACGG
sh4	TRCN0000011588	Ziel: Haarnadel: Forward: Reverse:	CTTACATTTATCAGTCCTGAA CCGGCTTACATTTATCAGTCCTGAACTCGAGTTCAGGACTGATAAATGTAAGTTTTT CCGGCTTACATTTATCAGTCCTGAACTCGAGTTCAGGACTGATAAATGTAAGTTTTTG AATTCAAAAACTTACATTTATCAGTCCTGAACTCGAGTTCAGGACTGATAAATGTAAG
shLGR5-5	TRCN0000011589	Ziel: Haarnadel: Forward: Reverse:	GCTCTACTGCAATTTGGACAA CCGGCTCTACTGCAATTTGGACAACTCGAGTTGTCCAATTCAGTAGAGCTTTTTT CCGGCTCTACTGCAATTTGGACAACTCGAGTTGTCCAATTCAGTAGAGCTTTTTTG AATTCAAAAAGCTCTACTGCAATTTGGACAACTCGAGTTGTCCAATTCAGTAGAGC
shEGFP	pEGFP U55761	Haarnadel:	CCGTACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGATTTTT

Tab. 3 - **Sequenzinformationen zu den eingesetzten shRNAs.** Die eingesetzten shRNAs standen als fertig erhältliche und ausgetestete lentivirale Partikel (Sigma-Aldrich, Mission®) zur Verfügung. In den Haarnadel-Sequenzen sind die beiden Anteile des Stamms (stem) durch *Kursivdruck*, der Schleifenanteil der Haarnadel (loop) durch Unterstreichen markiert (Horst 2009).

Die shRNA transduzierten Zelllinien mit den stärksten Expressionsminderungen wurden zur Untersuchung in die verschiedenen Experimente eingesetzt. Zur Selektion von shRNA-transduzierten Zellen wurde dazu mithilfe von Puromycin auf transduzierte Klone selektiert, weil die verwendeten Lentiviren neben der shRNA ebenfalls eine für Puromycin Resistenz kodierende Expressionskassette enthielten. Auf diese Weise konnten in den Zellkulturen Zellen angereichert werden, die verstärkt shRNA kodierende Plasmide enthielten und daher eine geringere LGR5-Expression aufwiesen als die unselektierte Population nach Transduktion. Dazu wurden die transduzierten Zellen für 10 Tage in Puromycin-haltigem Medium (Cat#540411, CALBIOCHEM) mit für die Zelllinien jeweils optimalen Mengen an Puromycin kultiviert. Diese jeweils optimalen Mengen an Puromycin waren zuvor durch Inkubation von parental Zellen in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Puromycin (*kill curves*) bestimmt worden: DLD1: 2,50 µg/ml, T84: 2,00 µg/ml, SW403: 1,00 µg/ml, LoVo: 2,50 µg/ml Puromycin. Insgesamt wurden so Zellkulturen gewonnen, die aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellklonen bestanden (*bulk*), da davon ausgegangen werden konnte, dass die Lentiviralen cDNA-Konstrukte in verschiedenen Zellen nicht immer an dieselbe Genomstelle integrierten. Dieser Tatbestand ist jedoch im Vergleich zu individuellen Klonen ein erheblicher Vorteil weil so klonale Effekte, die durch den Ort der Integration entstehen, z.B. Aktivierung eines Protoonkogens, ausgeschlossen werden konnten.

Um einen Einfluss von Puromycin während der Versuchsansätze auf die Physiologie der Zellen so weit wie möglich ausschließen zu können, wurde das Antibiotikum ca. 48 h vor dem Experiment durch Waschen und Wechsel des Mediums entfernt. Zum Ausschluss eines durch RNAi verursachten *off target* Effekts wurde in allen Versuchen jeweils eine Zellkultur (*bulk*) mitgeführt, die mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) spezifischer shRNA (shEGFP) transduziert und parallel zu den anderen shLGR5 Zelllinien selektiert und behandelt worden war.

Um den Effekt der LGR5-spezifischen RNAi in allen Experimenten zu kontrollieren, wurde die Menge an LGR5-RNA mithilfe von RT-qPCR in den transduzierten Zelllinien jeweils nach 4 und 18 Tagen nach Abschluss der Selektion getestet. Die entsprechenden RNA-Lysate werden im Folgenden als *knockdown*-Kontrollen *kd-LGR5<sub>4d</sub>* bzw. *kd-LGR5<sub>18d</sub>* bezeichnet.

## Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migration wurden *wound-healing* Assays mittels spezieller Kammern (*Culture inserts*- ibidi, 20 $\mu$ -Dish, #81176) durchgeführt (ibidi 2014). Diese bestehen aus zwei Kompartimenten, die durch einen Steg voneinander getrennt sind (Abb. 8). Auf diese Weise entsteht ein geometrisch einheitlicher Spalt, der im Unterschied zum *scratch* Assay wegen der definierten Spaltbreite eine genaue Analyse ermöglicht. Für die Experimente wurden etwa  $4.2 \times 10^4$  Zellen (70 $\mu$ l -  $6 \times 10^5$  Zellen/ml) in Standardmedium jeweils in die beiden Kompartimente der ibidi-Kammer ausgesät (*Step 1: cell seeding* - Abb. 8).

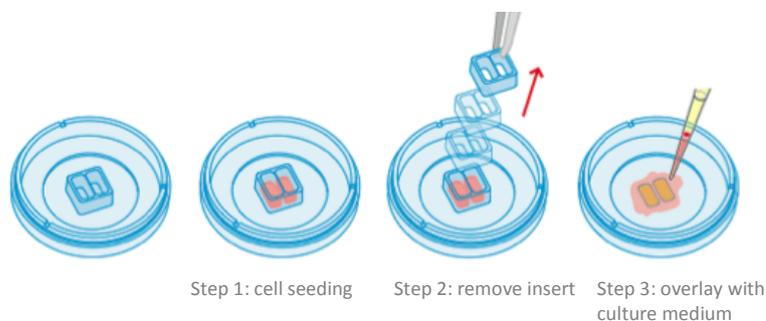


Abb. 8 - Aufbau von Migrationsexperimenten durch *wound-healing* Assays unter Einsatz von *ibidi*-Kammern (ibidi 2014).

Ca. 24 Stunden später waren etwa 60 % der Fläche bewachsen. Nach Kontrolle des Konfluenzgrades wurde die Kammer und damit der Trennsteg entfernt (*Step 2: remove insert* – Abb. 8), was einen Spalt (*wound*) gleichmäßiger Geometrie für alle Ansätze ergab. Nun wurden die Zellen mit Mitomycin C (10  $\mu$ g/ml)-haltigem Kulturmedium überschichtet, um die Zellteilung und damit Proliferation als interferierende Größe des Spaltschlusses ausschließen zu können (*Step 3: overlay with culture medium* – Abb. 8). Die Größe des Spalts wurde zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0) und in den folgenden 2-3 Tagen etwa alle 12 Stunden fotografisch dokumentiert. Um hier eine Standardisierung der Messung zu erreichen, wurde stets mit derselben Vergrößerung gemessen und die Messkammern vor der Dokumentation mithilfe eines Kreuztisches in die identische XY-Position gebracht. Schließlich erfolgte die Auswertung der Fotografien durch Bestimmung des Abstands in Pixeln mithilfe der Software *gimp 2.6* (The GIMP Team). Für die Berechnung des relativen Spalt- oder Wundschlusses wurde der kleinste dokumentierte Abstand des Spalts als Referenzmesswert verwendet.

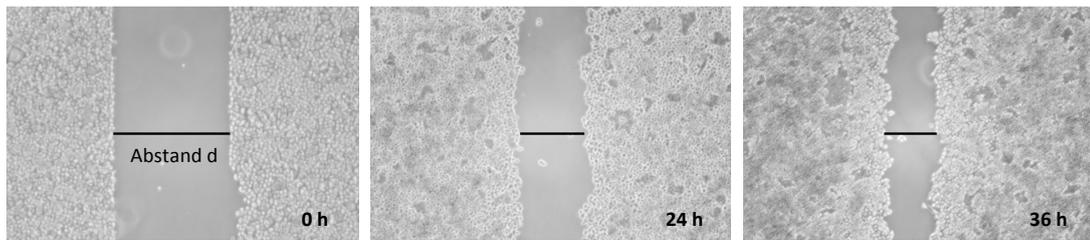


Abb. 9 - **Auswertung eines wound-healing Assays.** DLD1 Zellen wandern im Lauf der Zeit aufeinander zu. Durch Messung des Abstands (d) wurde dieser Vorgang dokumentiert und quantifiziert. Da die Zellen mit dem Mitoseinhibitor Mitomycin C behandelt worden waren kann ein Schluss des Spalts durch Proliferation ausgeschlossen werden.

### Invasionsassay

Eine weitere essentielle Voraussetzung für Metastasierung ist die Invasion der Tumorzellen in das umliegende Gewebe. Um den Einfluss von LGR5 auf die Invasion zu bestimmen, wurden shLGR5 bzw. shEGFP Tumorzelllinien zunächst in Standardmedium kultiviert, um dann für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert zu werden (hungern). Für die Messung wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 250  $\mu$ l DMEM mit 10  $\mu$ g/ml Mitomycin C in *transwell* Kammern ThinCerts™ (Greiner bio-one) gegeben, die mit 20 % BD Matrigel® (BD Biosciences) gefüllt worden waren (Abb. 10).

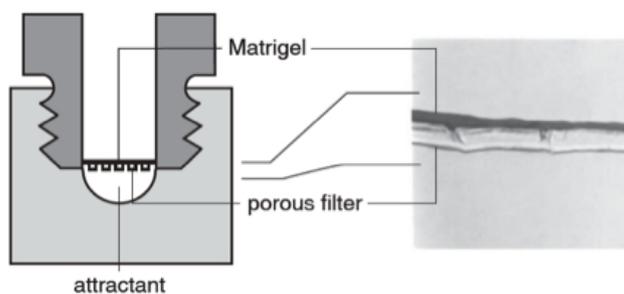


Abb. 10 - **Prinzip der Boyden Chamber** (Hynda K. Kleinman 2001). Die obere Kammer ist von der unteren durch eine mit Matrigel® überzogenen Membran getrennt.

Das Wandern der Zellen wurde durch Chemotaxis induziert, indem ein Serumgradient erzeugt wurde. Dazu wurde in die untere Kammer serumhaltiges Kulturmedium mit 10  $\mu$ g/ml Mitomycin C gefüllt (Abb. 10). Analog zum Invasionsassay wurde das Spindelgift Mitomycin C eingesetzt um die Proliferation der Zellen zu inhibieren, die für die Invasion eine störende Nebengröße (*off target effect*) darstellen könnte. Zu

optimalen Zeitpunkten wurde die Zahl der Zellen bestimmt, die bis auf die andere Seite der Inserts gewandert waren. Diese Zeitpunkte wurden in Vorexperimenten bestimmt und unterscheiden sich in den eingesetzten Zelllinien voneinander (DLD1/LoVo: 48h; T84: 144h).

Um den Grad der Invasion zu bestimmen wurden die Zellen mithilfe von Kristallviolett (0,1% (w/v) Kristallviolett in 20 % Methanol) für 5-20 Minuten gefärbt und die Zahl der Zellen mithilfe einer standardisierten Fotodokumentation bestimmt. Dazu wurden die Einsätze nach der Färbung unter identischen Bedingungen fotografiert (Abb. 11). Anschließend wurden die digitalen Fotografien mithilfe der ImageJ Software (NIH, Bethesda, U.S.A.) analog zum nicht-automatisierten Verfahren zur Zellzählung anhand des *PACKT* Handbuchs quantifiziert (Pascau 2013).

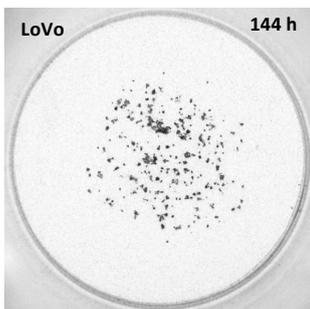
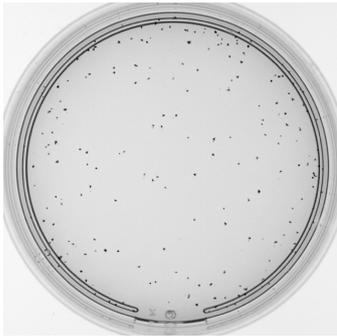


Abb. 11 - **Digitale Fotografie der Rückseite eines inserts einer Boydenkammer nach Kristallviolett-Färbung.** LoVo Zellen wurden für 6 Tage (144h) in einer Invasionskammer (Greiner, Bio one) inkubiert. Anschließend wurde das Matrigel® entfernt und die verbleibenden Zellen auf der Rückseite des *inserts* mithilfe von Kristallviolett gefärbt.

### **Transformationsassay (*colony formation*)**

Zur Beurteilung des adhäsionsunabhängigen Wachstums (Kleinman 2001) der Zellen wurde ein Transformations-Assay durchgeführt der auch als *colony formation Assay* bezeichnet wird. Hierbei werden die Zellen in Methylcellulose-haltigem Medium kultiviert, wodurch sie den Kontakt mit der Oberfläche des Zellkulturgefäßes (Adhäsion) verlieren (*floating*). Hierfür wurden 500 Zellen pro 35 mm Kulturgefäß (Greiner, Germany) in DMEM ohne FCS mit 0,9 % Methylcellulose ausgesät. Der Zeitpunkt der idealen Beurteilung des Koloniewachstums wurde für jede Zelllinie empirisch ermittelt (DLD1: 8 Tage, T84: 9 Tage). Zu diesen Zeitpunkten wurden die Zellen über Nacht mit MTT (Sigma #M5655) gefärbt (MTT 1:10 in DMEM ohne FCS; 300 µl pro Napf). Anschließend wurden Zahl und Phänotyp der entstandenen Kolonien durch standardisierte Fotografie-Bedingungen bestimmt (Abb. 13). Die digitalen Bilder

wurden schließlich mithilfe von ImageJ (NIH, Bethesda, U.S.A.) unter Einsatz des *cell counter tools* analog zum nicht-automatisierten Verfahren zur Zellzählung anhand des *PACKT* Handbuchs ausgewertet (Pascau 2013). Um das System zu eichen, wurden die Grenzwerte (*limits*) der Erkennung von Kolonien empirisch solange verändert, bis die Anzahl der Kolonien, die mit dem Auge mikroskopisch gezählt worden war, auch durch die Software abgebildet wurde.



shEGFP

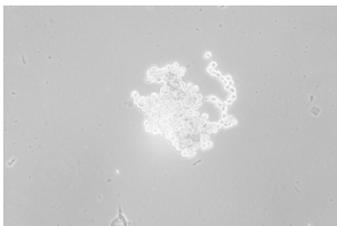


Abb. 12 - Auswertungsbeispiel der Kolonien im Transformations-/Methylcellulose-Assay am Beispiel von DLD Zellen.

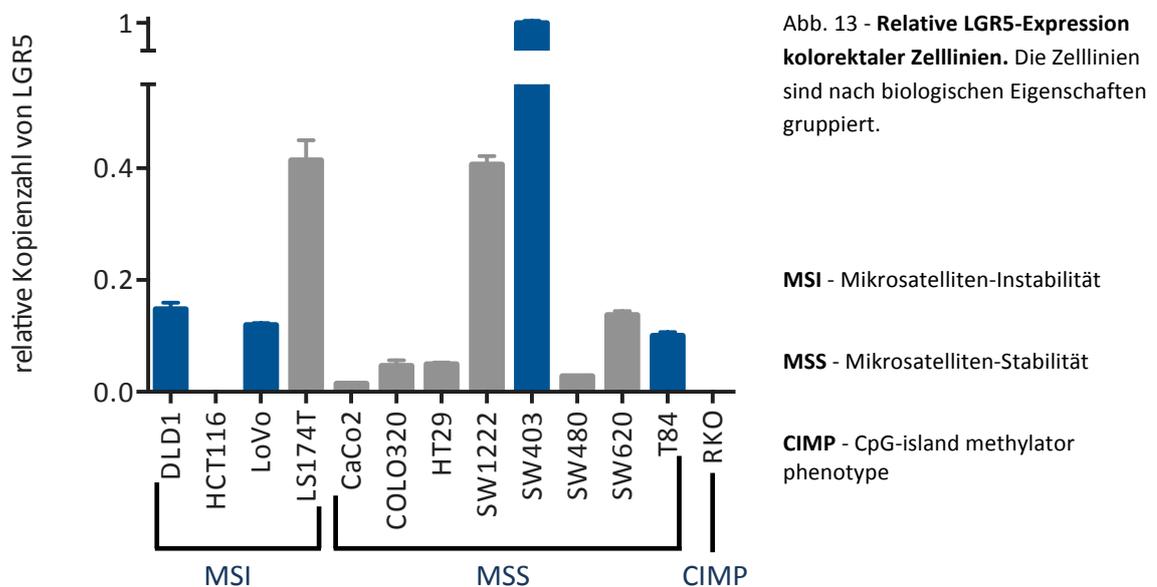
Oben: Übersicht über das Wachstum der Kolonien in einer Zellkulturschale.

Unten: Einzelne Zellkolonie. In keiner der untersuchten Zelllinien wurde dissoziiertes Wachstum beobachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Reduktion der LGR5-Expression durch RNA-Interferenz (RNAi)

Um geeignete Zelllinien für die experimentellen Arbeiten zu finden, wurden kolorektale Zelllinien gesucht, die hohe LGR5 Mengen exprimierten. Dazu wurde die LGR5-Expression der kultivierten kolorektalen Tumorzelllinien CaCo2, DLD1, HCT116, HT29, LO320, LoVo, LS174T, RKO, SW 403, SW480, SW620, SW1222 und T84 mithilfe von RT-qPCR bestimmt. Von den untersuchten Zelllinien zeigten DLD1, LoVo, LS174T, SW1222, SW403, SW620 und T84 die höchsten LGR5-Expressionen (Abb. 14) und wurden deshalb für die weiteren Experimente ausgewählt.



Von diesen sieben Zelllinien wurden DLD1, LoVo, SW403 und T84 für die folgenden Experimente eingesetzt, denn LS174T, SW1222 und SW620 zeigten einen aggregierend wachsenden Phänotyp sodass sie für die geplanten Versuche ungeeignet waren.

Anschließend wurden diese vier Zelllinien mit LGR5-spezifischen shRNA-Expressionsklonen transduziert, um die LGR5-Expression zu vermindern. Zum Ausschluss möglicher durch RNA-Interferenz verursachter Nebeneffekte (*off-target effects*) wurden EGFP-spezifische shRNA transfiziert. Der Grad der LGR5-Expressionsminderung wurde nach Transduktion und 10-tägiger Selektion (s. 4.3.3) mittels RT-qPCR bestimmt. Diese Messungen erfolgten jeweils 4 und 18 Tage nach Beendigung der Selektion. Es zeigte sich, dass zu beiden Zeitpunkten

(4 bzw. 18 Tage) die beiden shRNAs shLGR5-2 und shLGR5-5 in allen Zellen die LGR5-RNA am effektivsten herunterregulierten (Abb. 15), weshalb diese in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden.

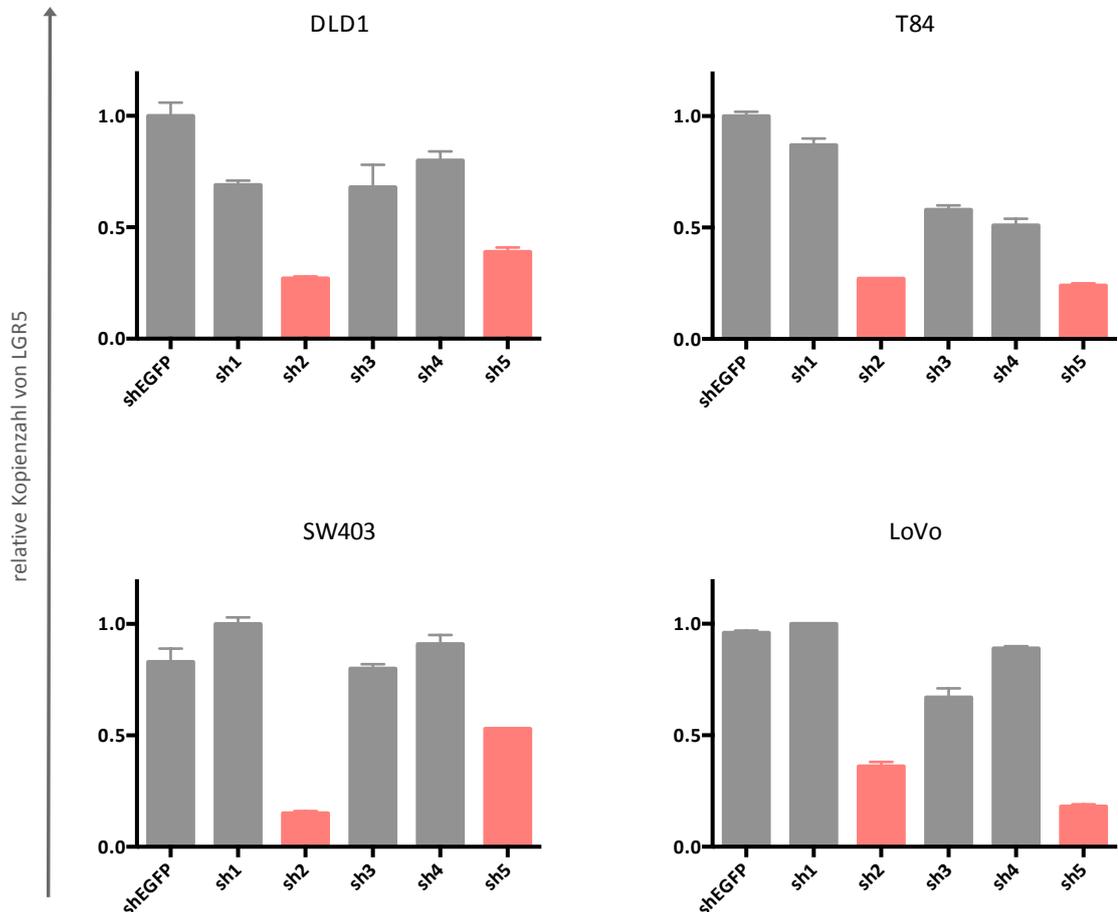


Abb. 14 - LGR5 shRNA2 und shRNA5 reduzieren die endogene LGR5 Expression in den kultivierten kolorektalen Zelllinien DLD1, T84, SW403 und LoVo am effektivsten. Die Messung erfolgte 18 Tage nach Selektion (*LGR5<sub>18d</sub>*) also insgesamt 28 Tage nach Transfektion.

Durch EGFP-spezifische RNAi wurde die LGR5-Expression nicht beeinflusst. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Effekte LGR5-genspezifisch waren. Ebenfalls zeigten die mit shEGFR-transfizierten Zelllinien keine Unterschiede zu den parental Zellen, sodass ebenfalls durch die Transduktion induzierte unspezifische Nebeneffekte so gut wie ausgeschlossen werden konnten. Da sich die parental und die shEGFP-transfizierten Zellen auch in allen folgenden Experimenten analog verhielten,

wird im Folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Ergebnisse der parentalen Zellen verzichtet.

Weiterhin konnte der Effekt der LGR5 spezifischen RNAi für mindestens 18 Tage nach Ende der Selektion nachgewiesen werden. Somit war der *knockdown* hocheffizient und daher wurden alle Analysen mit transient transfizierten Zelllinien durchgeführt. Zusätzlich wurde der Erfolg des *knockdowns* von LGR5 für jeden Versuch verifiziert, indem die LGR5-Expressions-Niveaus jeweils 4 (*LGR5<sub>4d</sub>*) bzw. 18 Tage (*LGR5<sub>18d</sub>*) nach Ende der Selektion kontrolliert wurden.

In diesen Vorarbeiten wurde ein transientes LGR5-spezifisches RNAi System für kolorektale Tumorzelllinien entwickelt, mit dessen Hilfe der Einfluss von LGR5 auf zelluläre Eigenschaften nun weiter untersucht werden konnte.

## **5.2 Einfluss von LGR5 auf Markerprofil und Differenzierungstyp kolorektaler Zellen**

Um nun den Einfluss von LGR5 auf Eigenschaften kolorektaler Tumorstammzellen zu untersuchen wurde die Änderung der LGR5-spezifischen RNAi auf das Expressionsniveau typischer Tumorstammzell- und EMT-assoziiierter Marker untersucht. Als Marker für Tumor *stemness* wurden dazu die Expression der Gene ASCL2, OLFM4, CD44, CD133 und CD166 ausgewählt (van der Flier 2009) und für die Untersuchung der EMT das epitheliale Markergen E-Cadherin sowie das mesenchymale Markergen Vimentin und der mesenchymale Master-Induktor ZEB-1. Dazu wurde die mRNA Expression dieser Gene 18 Tage nach Selektion mittels RT-qPCR gemessen (*LGR5<sub>18d</sub>*) und die Ergebnisse mithilfe einer Clusteranalyse vergleichend untersucht. Zwar wurde die Expression von LGR5 erwartungsgemäß durch die RNAi deutlich reduziert (Abb. 16, erste Reihe des *heat plots*), jedoch hatte dies keinen relevanten Unterschied in der Expression der untersuchten Stammzellmarker- und EMT-assoziierten Gene zur Folge (Abb. 16, Zeilen 2-9).

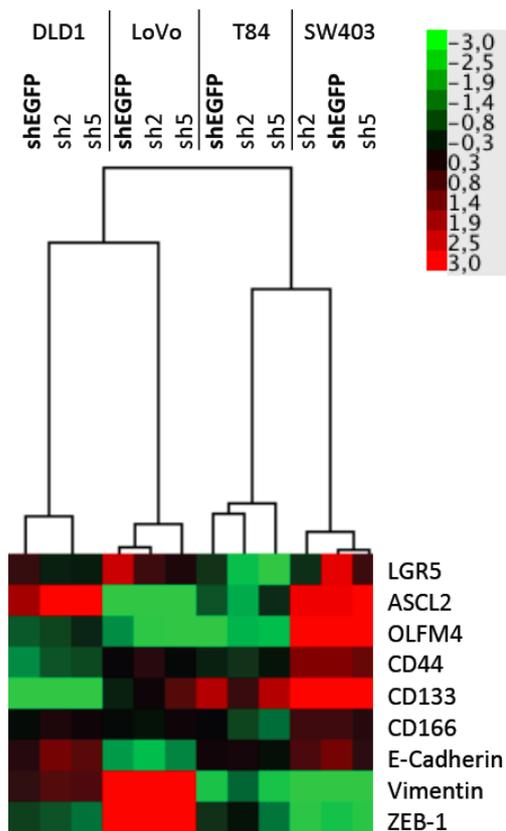


Abb. 15 - Die **Minderexpression von LGR5 beeinflusst weder die Expression kolorektaler Tumorstammzell- noch EMT-Marker**. RT-qPCR-Analyse von Zelllysaten nach RNAi (*LGR5<sub>18d</sub>*). Die Analyse aller Gene erfolgte aus denselben RNA-Lysaten. Trotz erfolgreichem *knockdown* von LGR5 (erste Zeile des *heat plots*) zeigten sich keine deutlichen Änderungen in der Expression der kolorektalen Tumorstammzellmarker ASCL2, OLFM4, CD44, CD133 oder CD166. Vergleichbar zeigte sich ebenfalls keine Änderung in der Expression der EMT Marker E-Cadherin und Vimentin sowie des EMT *master switches* Faktors ZEB-1. Dabei ist in den **fett gedruckten** Spalten jeweils die Kontrolle (**shEGFP**) zu sehen und in den beiden Folgespalten (Normaldruck) jeweils die Ergebnisse aus dem LGR5-spezifischen *knockdown* mithilfe der beiden LGR5-spezifischen shRNAs 2 und 5. Die Unterschiede in der Genexpression sind aus der Legende des *heat plots* zu entnehmen.

Also hatte eine Verringerung der Expression von LGR5 in dem gewählten Ansatz keinen Einfluss auf das Expressionsprofil von *cancer stemness* oder EMT induzierenden oder assoziierten Genen zur Folge.

### 5.3 Einfluss von LGR5 auf die tumorigenen Fähigkeiten kolorektaler Tumorzellen

Um den Einfluss von LGR5 auf die für Metastasierung essenziellen Eigenschaften Migration, Invasion und Transformation (*colony formation*) zu untersuchen, wurde deren Abhängigkeit von der LGR5-Expression in kolorektalen Tumorzellen gemessen. Hierzu wurden die gängigen *in vitro*-Modelle

- *wound-healing* (Migration),
- *ThinCerts*/Matrigel® (Invasion) und
- Methyl-Cellulose (adhäsionsunabhängiges Wachstum)

eingesetzt, da diese als besonders zuverlässig, reproduzierbar und repräsentativ gelten (Hiddemann 2010).

### 5.3.1 Einfluss von LGR5 auf die Migration kolorektaler Tumorzellen

Für die Untersuchung der Migrationsfähigkeiten wurden *wound-healing* Assays mit Tumorzellen nach RNAi mithilfe von *ibidi*-Kammern durchgeführt. Dazu wurde der Abstand der Wundränder alle 12 Stunden bis zum vollständigen Wundschluss fotografisch dokumentiert und ausgewertet. Es konnte kein signifikanter Unterschied weder in der Änderung des Abstands der Wundränder – also der Geschwindigkeit des Wundschlusses – noch der Wundrandkonfiguration zwischen den Kontrollzellen (shEGFP) und den Zellen mit verringerter LGR5-Expression (shLGR5-2, shLGR5-5) gefunden werden (Abb. 17).

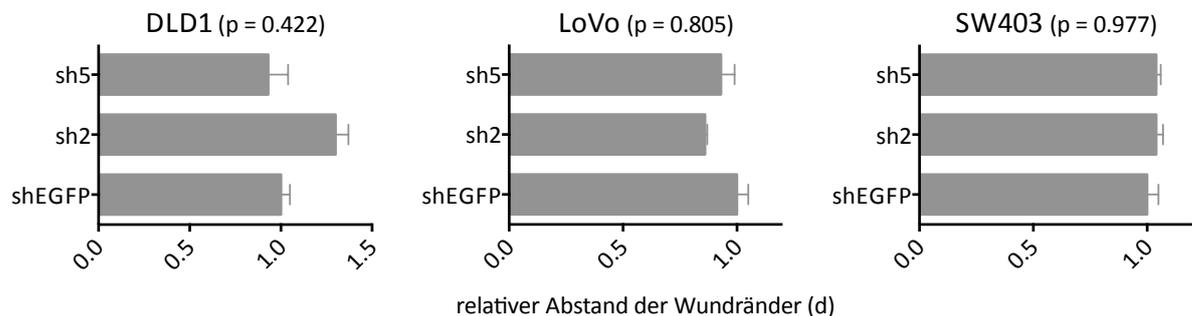


Abb. 16 - Verlust von LGR5-Expression führt zu keiner signifikanten Änderung der Migrationsfähigkeit kolorektaler Tumorzellen. Relativer Abstand der Wundränder (d): 36 (DLD1), 24 (LoVo) bzw. 12 Stunden (SW403) nach Spaltbildung durch Entfernung der *ibidi*-Kammer. p-Werte wurden mithilfe eines  $\chi^2$ -Modells bestimmt.

Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss von LGR5 auf die Fähigkeit kolorektaler Tumorzellen zur Migration.

### 5.3.2 Einfluss von LGR5 auf die Invasion kolorektaler Tumorzellen

Anschließend wurde der Einfluss von LGR5 auf die Invasionsfähigkeit kolorektaler Tumorzellen nach LGR5-spezifischer RNAi untersucht. Zur Bestimmung des Einflusses von LGR5 auf die Invasionsfähigkeit wurden *transwell/ThinCerts*-Assays eingesetzt. Zu geeigneten Zeitpunkten wurde dazu die Zahl der Tumorzellen, die durch das Matrigel® auf die andere Seite des *transwell* Napfes gewandert waren - und somit den Grad der Invasion widerspiegeln - mittels Kristallviolett-färbung, Fotodokumentation und digitaler Densitometrie quantifiziert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Invasion zwischen Tumorzellen mit normaler (shEGFP) und verminderter LGR5-Expression (shLGR5-2, shLGR5-5) (Abb. 17).

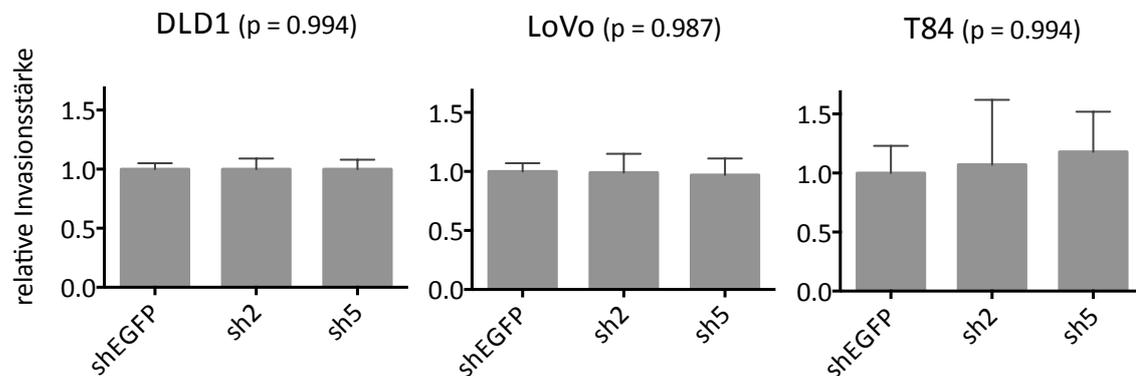


Abb. 17 - Verlust von LGR5-Expression führt zu keiner signifikanten Änderung der Invasionsfähigkeit kolorektaler Tumorzellen. Gezeigt sind die relativen Invasionsstärken der Zellen nach 48 (DLD1, LoVo) bzw. 144 Stunden (T84) nach Transfer auf die ThinCerts. Dabei wurden alle Werte auf die Invasion der Kontrollzellen (shEGFP) bezogen.

Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss von LGR5 auf die Fähigkeit kolorektaler Tumorzellen zur Invasion.

### 5.3.3 Einfluss von LGR5 auf adhäsionsunabhängiges Wachstum kolorektaler Tumorzellen

Der Einfluss von LGR5 auf adhäsionsunabhängiges Wachstum (Transformation/ *colony formation*) kolorektaler Tumorzellen wurde nach LGR5 spezifischer RNAi in Methyl-Cellulose-Assays (*anchorage-independent growth*) untersucht. Zu geeigneten Zeitpunkten wurden dazu Form, Größe und Anzahl der gebildeten Kolonien

fotografisch dokumentiert und digital ausgewertet. Es zeigte sich auch hier, dass eine Änderung der Stärke der LGR5-Expression keinen Einfluss auf die Anzahl gebildeter Kolonien hatte (Abb. 18).

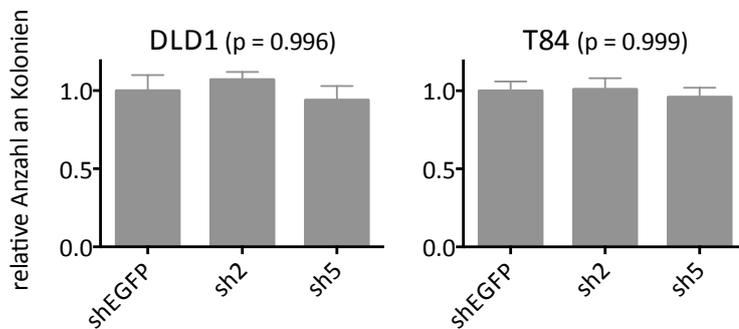
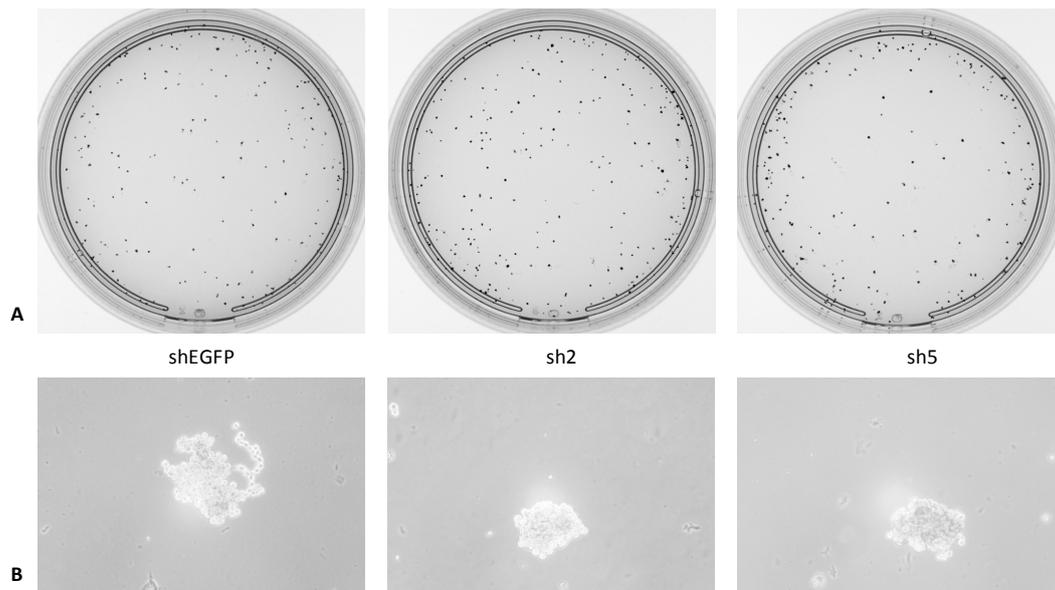


Abb. 18 - Verlust von LGR5-Expression führt zu keiner signifikanten Änderung von adhäsionsunabhängigem Wachstum in kolorektalen Tumorzellen. Relative Anzahl gewachsener Kolonien: 8 (DLD1) bzw. 9 Tage (T84) nach Aussaat. Die Ergebnisse sind auf den Wert der jeweiligen Kontrolle (shEGFP) bezogen.

Auch das Aggregationsverhalten der Tumorzellen wurde durch die LGR5-spezifische RNAi nicht beeinflusst, denn die einzelnen Kolonien aus den unterschiedlichen Ansätzen (shEGFP versus shLGR5-2, shLGR5-5) präsentierten sich in der mikroskopischen Beurteilung mit identischen Formen und Größen (Abb. 19).

Demnach hat eine Expressionsminderung von LGR5 im untersuchten Modellsystem keinen Einfluss auf die Fähigkeit kolorektaler Tumorzellen zu adhäsionsunabhängigem Wachstum.



**Abb. 19 – Vergleich der Kolonien unterschiedlicher Klone von DLD Zellen im Transformations-/Methylcellulose-Assay:** (A) Übersicht über das Wachstum der Kolonien in einer Zellkulturschale. Hier zeigten sich sowohl bei manueller als auch bei digitaler Quantifizierung der Kolonien keine signifikanten ( $p=0.996$ ) Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen (vgl. auch Abb. 19). (B) Einzelne Zellkolonien. In allen Zellklonen wuchsen die Kolonien gleichförmig aggregierend, d.h. in keiner der untersuchten Zelllinien wurde dissoziiertes Wachstum beobachtet.

In der Zusammenfassung aller Ergebnisse lässt sich somit schließen, dass ein *knockdown* von LGR5 in kultivierten kolorektalen Tumorzellen keinen Einfluss auf die zellulären Eigenschaften Migration, Invasion oder adhäsionsunabhängiges Wachstum hat, was Grundvoraussetzungen für Metastasierung sind.

## 6 Diskussion

Fortgeschrittene Stadien der Metastasierung sind ein therapielimitierender Faktor des kolorektalen Karzinoms. Für diese Tumorprogression werden kolorektale Tumorstammzellen (coCSC) verantwortlich gemacht (Brabletz 2005, Burkert 2006, Reya 2001), denn sie besitzen die notwendigen Fähigkeiten zur Metastasierung wie erhöhte Zellmotilität, -Invasivität und adhäsionsunabhängiges Wachstum. Der WNT-Signalweg reguliert dabei maßgeblich die *stemness* dieser Zellen und fördert so ihre tumorigenen Eigenschaften, weshalb er als zentraler Signalweg bei der Entstehung und Progression kolorektaler Karzinome gilt. Der kolorektale Tumorstammzellmarker LGR5 – gleichzeitig Markerprotein adulter Stammzellen des murinen Dünndarms – ist Zielgen und gleichzeitiger Agonist des WNT/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Denn LGR5 aktiviert den WNT-Signalweg durch:

- (1) Bindung des Liganden R-Spondin1 (R-Spo1) an LGR5, was zu einer Aktivierung von *frizzled (fz)* und zur Entfernung der beiden frizzled Ubiquitin-E3-Ligasen führt.
- (2) Inhibition des WNT-Inhibitors DKK-1.

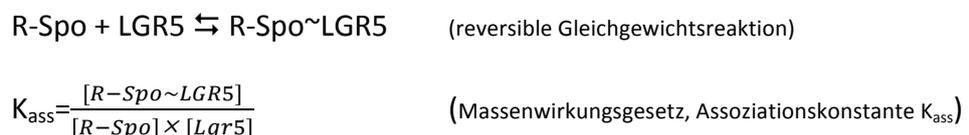
Bisherige Studien lieferten zahlreiche Hinweise für eine Assoziation zwischen der Expression von LGR5 mit der Progression der kolorektalen Karzinogenese. Als  $\beta$ -Catenin-Zielgen wird die LGR5 Expression selektiv durch APC-Mutationen dereguliert. Weiterhin sind die für eine Akkumulation von Mutationen in Frage kommenden Zellen die LGR5-positiven, intestinalen Stammzellen (Barker 2009). Daher sind diese Zellen aus Sicht des Expressionsprofils und der zugrunde liegenden Chromatinstruktur in der Lage LGR5 zu exprimieren, sodass es naheliegend erscheint, dass diese Eigenschaft auch in den sich ableitenden Tumorstammzellen zu finden ist. Eine Assoziation der LGR5-Expression mit Tumorigenität ergibt sich aus einer Reihe verschiedener Zusammenhänge. So zeigen die allermeisten metastasierten Tumoren und sporadischen Kolonadenome eine Überexpression von LGR5. Nur LGR5-positive kolorektale Tumorzellen können *in vitro* effizient Sphäroide bilden (Uchida 2010), was ein klares Indiz für *cancer stemness* ist. Eine darmspezifische Überexpression des LGR5-Liganden R-Spondin1 (RSpo1) führt zu einer generalisierten Vergrößerung und einer Verdoppelung von Gewicht und Durchmesser des Darms bei Hyperproliferation der

Krypten. Gleichzeitig geht mit der gesteigerten R-Spondin Expression eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin einher (Kemper 2012). Schließlich korreliert die LGR5-Expression mit Lymphgefäßinvasion sowie mit Lymphknotenmetastasierung und Tumorstadium (Uchida 2010). Somit konnte LGR5 mit einer Vielzahl von für die Tumorigenese wichtigen Eigenschaften der Tumorzellen assoziiert werden. Unklar blieb jedoch bisher, ob LGR5 dabei lediglich ein Marker für diese Tumorzellen ist oder eine funktionelle Rolle für die Induktion oder Aufrechterhaltung dieser Eigenschaften spielt.

### **6.1 LGR5 besitzt bei der kolorektalen Karzinogenese keine intrinsische funktionelle Rolle**

Um die funktionelle Rolle von LGR5 für die Biologie von kolorektalen Tumorzellen besser zu verstehen, wurde die LGR5 Expression mithilfe von RNAi verringert. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine Minderexpression von LGR5 keine Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit kolorektaler Tumorzellen *in vitro* hatte. Dieses unerwartete Ergebnis gab Anlass zur genaueren Untersuchung des vermeintlich intrinsischen Einflusses von LGR5 auf die kolorektale Tumorigenese. Daher wurden im Folgenden Eigenschaften der Tumorzellen untersucht, die wichtige Voraussetzungen für Metastasierung sind (*hallmarks of cancer*) und weiterhin analysiert, ob sich durch die Reduktion der LGR5 Expression Auswirkungen auf *cancer stemness* oder EMT zeigten, indem Änderungen in der Expression von Markern untersucht wurde, die mit diesen Eigenschaften assoziiert sind. Zunächst konnte in allen Experimenten gezeigt werden, dass durch die RNAi die Mengen an endogener LGR5-mRNA reduziert wurden, der experimentelle Ansatz also funktioniert hatte (*proof of concept*). Überraschenderweise zeigte sich jedoch kein Effekt auf die Eigenschaften Migration, Invasion, Transformation (*anchorage independent growth*) sowie auf die Expression von *cancer stem cell* sowie EMT-Markern. Somit übernimmt LGR5 offenbar keine relevante intrinsische Rolle für die Aufrechterhaltung maligner Eigenschaften kolorektaler Tumorzellen.

Umgekehrt zeigte eine andere Arbeit einen Zusammenhang zwischen einer Reduktion der LGR5 Expression und Karzinogenese treibenden Eigenschaften (Walker 2011). Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich dadurch lösen, dass die beobachteten Effekte in diesem experimentellen System nicht auf einer intrinsischen Rolle von LGR5 basierten, sondern auf der Bindung von RSpO1 und somit einer Aktivierung des LGR5 Signalwegs. Somit käme LGR5 selbst eine *passenger*- aber keine *driver*-Funktion zu. Im Licht dieser Ergebnisse erklären sich auch die Ergebnisse einer Arbeit, die ebenfalls die LGR5 Expression durch RNAi reduzierte, aber Effekte auf die Biologie der Tumorzellen nachweisen konnte (Walker 2011). In jenem Ansatz wurde ein mit dieser Arbeit vergleichbarer Versuchsaufbau eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass eine Minderepression von LGR5 invasives und adhäsionsunabhängiges Wachstum in kolorektalen Zellen fördert, eine Überexpression hingegen die Zelladhäsion verstärkt und Tumorigenität inhibiert (Walker 2011). Diese Ergebnisse stehen somit den Ergebnissen dieser Arbeit aber auch der Rolle, die LGR5 momentan zugeschrieben wird (Nakata 2014), gegenüber. Dieser vermeintliche Gegensatz lässt sich jedoch gut auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes erklären, indem das Verhältnis von Liganden (R-Spondin) und Rezeptoren (LGR5) betrachtet werden, welche die R-Spo/ LGR5 mediierten Effekten direkt beeinflussen. Lagen in den eingesetzten Medien limitierende Mengen an RSpO1 vor, so sollte nur ein kleiner Teil der LGR5 Moleküle Bindung von RSpO1 zeigen. In der Folge würde in der Mehrzahl der Ereignisse eine Interaktion zwischen den *frizzled (fz)*- und RSpO1-freien LGR5 Rezeptoren zu beobachten sein. Durch den *knockdown* von LGR5 entsteht dann eine Situation, in der zwar weniger Rezeptoren in der Zellmembran zu finden sind, diese jedoch wahrscheinlicher aufgrund des Massenwirkungsgesetzes an RSpO1 binden:



In diesem Szenario findet bei erfolgreicher Kopplungen der *frz*- und LGR5 Rezeptoren häufiger eine Aktivierung durch RSpO1 statt, was gleichbedeutend mit einer gesteigerten Aktivierung des WNT/  $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist (Abb. 20). Umgekehrt

sollte eine Überexpression in diesem System zu einer Verringerung eines WNT/ $\beta$ -Catenin induzierten Signals führen.

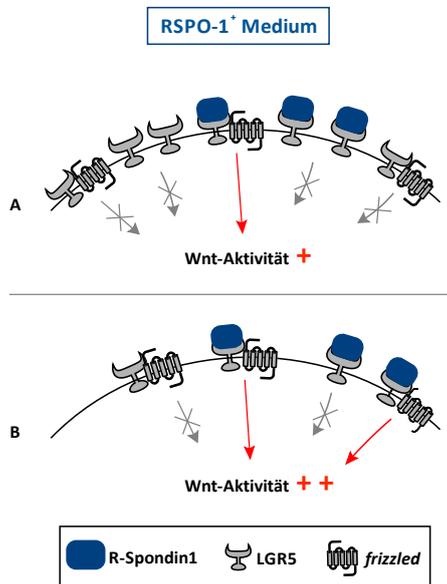


Abb. 20 – Dosis-Modell zur Erklärung der Effekte von R-Spondin1 bei limitierenden Mengen an LGR5 Rezeptor. (A) Bei geringen Mengen an RSpO1 liegt nur eine geringe Zahl an LGR5 Rezeptoren mit RSpO1 gebunden vor. Daher werden ebenfalls nur wenige Kombinationen an *frz*-Rezeptoren vorliegen, die LGR5/RSpO1 Dimere gebunden haben. (B) Nach Reduktion der Expression von LGR5 (z.B. nach RNAi) ist die Zahl der LGR5 Rezeptoren verringert. Bei gleicher Menge an RSpO1 ist die relative Anzahl an LGR5/ RSpO1 Dimeren größer und somit auch die Anzahl an *frz*-Rezeptoren, die mit LGR5/RSpO1 Dimeren interagieren. Daher kommt es in dieser Situation zu einer verstärkten WNT-Signal-Aktivität.

Daraus ergibt sich, dass bei LGR5-spezifischer RNAi in RSpO1-freiem Medium keine Beeinflussung der WNT-Aktivität erfolgen sollte.

Auf der anderen Seite stellt sich natürlich die Frage, wie es sich mit der Aktivität des WNT-Signalwegs verhält, denn das vorgeschlagene Dosis-Modell kann nur dann funktionieren, wenn LGR5 einen Einfluss auf die Aktivität des aktiven WNT-Signalwegs hat. Für eine basale Aktivität des WNT-Signalwegs müssen entweder WNT3a-Liganden im Medium oder eine intrinsische Aktivierung des Signalwegs vorhanden sein. Nachgewiesenermaßen besitzen kolorektale Tumorzelllinien eine ausreichende intrinsische WNT-Aktivität (Rosin-Arbesfeld 2003). Zudem sorgt eine homo- bzw. heterozygote APC-Mutation in allen verwendeten Linien für die konstitutive Aktivierung des Signalwegs (Rowan 2000).

## 6.2 Grenzen des Modells und Einordnung

Das in dieser Arbeit eingesetzte Versuchsmodell birgt - wie alle *in vitro* Modelle - eine Reihe an möglichen Fehlerquellen, was eine Übertragung auf einen klinischen Einsatz

erschwert oder gar verhindert. Denn kolorektale Tumorzelllinien wurden durch Wachsen unter den bekannten *in vitro* Konditionen aus einer Masse an Krebszellen selektiert. Damit ist vollkommen unklar, in welcher Weise diese Zelllinien kolorektale Tumoren repräsentieren. Weiterhin ist bekannt, dass es unterschiedliche Sub-Klassen an kolorektalen Tumoren gibt, z.B. (1) Mutationen im WNT-/  $\beta$ -Catenin-Signalweg, (2) hochgradige Mikrosatelliteninstabilität, (3) CpG island methylator phenotype (CIMP) (Ahuja 1997) oder auf der Basis von Expressionsstudien vier Subklassen (Sadanandam 2013). Es ist unbekannt, welche der kultivierten kolorektalen Zelllinien diese Tumortypen repräsentieren. Interessanterweise scheint nur eine der Tumorzelllinien - nämlich RKO - den CIMP Phänotypen widerzuspiegeln, der jedoch etwa 15-20 % aller sporadischen kolorektalen Tumoren ausmacht (Ogino 2006). Diese Diskrepanz zeigt bereits auf, dass Tumorzellen aus CIMP Tumoren schlechter in Zellkultur anzuwachsen scheinen. Zudem kommt hinzu, dass die Zelllinien, die für die Experimente in dieser Arbeit eingesetzt wurden, deshalb ausgewählt wurden, weil sie diejenigen waren, die größere Mengen an LGR5 exprimierten. Umgekehrt zeigt diese Auswahl bereits an, dass nicht alle kolorektalen Tumorzelllinien LGR5 in größeren Mengen zu exprimieren scheinen. Da LGR5 ein Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist (Barker 2007) und praktisch alle kolorektalen Tumorzelllinien - mit Ausnahme von RKO - eine den kanonischen WNT-Signalweg aktivierende Mutation tragen (Ilyas 1997), stellt sich die Frage, inwieweit die für die Versuche ausgewählten kolorektalen Zelllinien sporadische kolorektale Tumoren repräsentieren und inwieweit sich Ergebnisse mit diesen Zelllinien daher auf die *in vivo* Situation translatieren lassen.

Ein weiterer entscheidender Unterschied zu Tumoren *in vivo* ist das Fehlen der natürlichen Mikroumgebung und der modulierende Einfluss des Stromas (Hanahan 2011). Dieser Umstand erschwert die Übertragung der gefundenen Zusammenhänge auf Tumorzellen *in vivo* erheblich, denn durch die Tumorumgebung werden eine Vielzahl löslicher Faktoren aber auch zellgebundener Liganden präsentiert, welche die Tumorzelle beeinflussen (Liotta 2001), die umgekehrt wiederum einen Einfluss auf die Stromazellen haben kann, sodass komplexe Regulationskreise entstehen können (Cao 2014).

Eine weitere Schwachstelle in den experimentellen Systemen stellt der fehlende Nachweis einer Verringerung der LGR5-Expression auf Proteinebene dar. Da mit keinem der bislang kommerziell verfügbaren Antikörper die Etablierung eines LGR5-spezifischen Western Blots gelang, konnte dieser experimentelle Ansatz nicht durchgeführt werden. Dies kann zum einen daran liegen, dass Tumorzellen nur geringe Mengen an LGR5-Protein exprimieren (Barker 2008, Barker 2007), zum anderen, dass es schwierig ist, Antikörper zu entwickeln, die denaturiertes LGR5-Protein erkennen können. Denn in FACS Analysen - also nativem LGR5 Protein - scheinen LGR5 spezifische Antikörper zumindest bei ausreichender Expression von LGR5 zu funktionieren (Kemper 2012). Umgekehrt ist es daher sehr kritisch zu betrachten, ob die bisherigen veröffentlichten Ergebnisse zur LGR5 Expression in fixiertem humanem Gewebe (Fan 2010, Kleist 2011, Uchida 2010) stimmen. Somit sind bisher kaum valide Daten aus humanen kolorektalen Tumoren bekannt, die als Grundlage für die Einordnung der Relevanz von *in vitro* Daten eingesetzt werden könnten.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass RNAi nie zu einem vollständigen Verlust der Expression des jeweiligen Zielgens führt. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar eine Reduktion auf bis zu 15 % des ursprünglichen mRNA Expressionsniveaus erreicht, doch bleibt zum einen offen, welchen Effekt diese Reduktion auf die LGR5 Proteinmenge hatte. Zum anderen bleibt unklar welche Effekte eine verbleibende Proteinmenge von ca. 15 % auf die Physiologie der Zelle hat.

Eine weitere Unsicherheit wird dadurch geschaffen, dass LGR5 Bestandteil einer größeren Familie von Proteinen ist. Neben LGR5 gehören auch noch die Rezeptoren LGR4 oder LGR6 dazu (Hsu 2000, Loh 2000), die ebenfalls R-Spondine binden können (Carmon 2011) und dadurch bei Ausfall von LGR5 für eine Kompensation der Effekte sorgen könnten. Um diesen Kompensationseffekt auszuschließen, wäre eine Abschaltung des gesamten LGR-Systems notwendig, was zumindest experimentell praktisch mit einem sehr hohen Aufwand verbunden wäre.

Vor diesem Hintergrund scheint LGR5 allein keine Rolle für die Tumorprogression zu spielen, sondern seinen Effekt ausschließlich nach Bindung von RSpO-1 durch Kostimulation mit *frz*-Rezeptoren zu entwickeln. Somit ist für eine Beurteilung der Rolle von LGR5 ein immunhistochemischer Nachweis von LGR5 allein nicht aussagekräftig. Vielmehr müsste parallel die Expression von RSpO-1 mit untersucht

werden oder - noch besser - eine Möglichkeit gefunden werden, den Aktivierungszustand des LGR5-Rezeptors *in vivo* bestimmen zu können, sei es direkt oder indirekt. Dadurch kann es möglich sein, dass die Aktivierung des LGR5-Systems nur auf wenige Tumorzellen beschränkt bleibt, die in einem RSpO-1 Umfeld existieren. Diese Heterogenitäten sind in der Tumorbilogie nichts Ungewöhnliches. So zeigen trotz Mutation des Tumorsuppressorgens APC (*adenomatous polyposis coli*) oder des Onkogens  $\beta$ -Catenin nur wenige kolorektale Tumorzellen eine nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin und somit eine Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs. Diese Zellen befinden sich in einem schmalen Saum an der invasiven Front kolorektaler Tumoren (Brabletz 2001, Brabletz 2005).

### 6.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Wenn LGR5 keine tumortreibende Rolle (*driver*) zukommt, ist ein LGR5-spezifischer therapeutischer Ansatz kritisch zu sehen, da hierdurch keine oder aber eine weniger effektive Wirkung zu erwarten ist. Eine Ausnahme bestünde, wenn eine LGR5/ RSpO-1 Interaktion und Aktivierung in Tumorstammzellen stattfände, die einen essentiellen Beitrag für das Überleben dieser so differenzierten Zellen darstellen würde. Denn diese Zellen sind gegen die klassischen chemotherapeutischen Ansätze resistent (Walker 2011). So werden durch Chemotherapie *in vitro* Tumorstammzellen angereichert, indem die differenzierten Tumorzellen sterben. Dazu müsste jedoch erst untersucht werden, ob durch die Interaktion von RSpO-1 mit LGR5 *cancer stemness* induziert werden kann.

Ein alternativer Ansatz könnte jedoch darin bestehen, LGR5 als Marker für kolorektale Tumorzellen zu sehen. Wenn hocheffiziente LGR5-bindende Antikörper zur Verfügung stehen, könnten diese mit zytotoxischen Substanzen gekoppelt werden, die nach intrazellulärer Aufnahme der Antikörper im Absterben der Tumorzellen resultieren. Dieser Ansatz ist bereits für einen gegen Her2 (*human EGFR-2*) gerichteten Antikörper (T-DM1, Trastuzumab-Emtansin, Kadcyla®) klinisch erprobt und könnte auf das LGR5 System übertragen werden. Diese Möglichkeit besteht jedoch nur, wenn LGR5 ein spezifischer kolorektaler Tumormarker ist und sich die Therapie nicht gegen adulte kolorektale Stammzellen richtet, wobei bis heute noch unklar ist, ob die Population humaner coCSC durch LGR5 markiert und definiert wird. Funktionelle Daten wurden

bisher nur in Mausmodellen generiert (Barker 2007). Hier zeigte sich, dass LGR5 vor allem in kleinen stiftförmigen Zellen (*small columnar cells*) an der Kryptenbasis von Dünndarmkrypten exprimiert wird. Diese Zellen liegen zwischen den Paneth-Zellen und werden durch Wachstumssignale der Paneth-Zellen stimuliert, die im Dickdarm fehlen. Hinzu kommt, dass selbst im Maus-System unklar ist, ob die LGR5-positiven Zellen die eigentlichen adulten Stammzellen sind oder die in der Position +4 vorkommenden *label retaining cells*. Diese Zellen exprimieren kein LGR5, dafür jedoch Bmi1 (Sangiorgi 2008). Ein Verlust von Bmi1 durch *knockdown* in Mäusen führt zum Verlust des intestinalen Kompartiments (Sangiorgi 2008). Hinzu kommt, dass nach letaler Bestrahlung die Bmi1-positiven Zellen LGR5-exprimierende Zellen, aber nicht umgekehrt bilden können (Tian 2011). Diese unterstützen den Zweifel an der Bedeutung LGR5-positiver Stammzellen im Darm. Denn im Gegensatz zu sich schnell teilenden LGR5-positiven Zellen proliferieren Bmi1-positive Zellen langsam, was deutlich besser in Einklang mit der Stammzelldefinition zu bringen ist. Bezogen auf diese Eigenschaft würden sich die LGR5-positiven Zellen eher dem Kompartiment der *transit amplifying* zuordnen lassen. Schließlich fehlt der Beweis, dass sich die bisher größtenteils im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse ohne Weiteres auf das Kolon oder Kolorektum des Menschen übertragen lassen. Diese Übertragbarkeit wird zwar aufgrund der zahlreichen funktionellen Parallelen zur menschlichen Pathophysiologie regelhaft praktiziert (Weinberg 2007), ein endgültiger Gültigkeitsnachweis steht jedoch aus.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass LGR5 keine intrinsische funktionelle Rolle bei der Regulation der *cancer stemness* in kolorektalen Tumorzellen übernimmt, sondern die Deregulation des WNT-Signalwegs mit folgender Tumorprogression vielmehr ein R-Spondin1-mediierter Effekt zu sein scheint. In diesem Kontext scheint LGR5 weniger eine funktionelle- (*driver*) denn eine markierende (*passenger*) Rolle zu spielen. Eine bessere Kontrolle des Zellkulturmodells und die Entwicklung geeigneter LGR5-spezifischer Antikörper sind wichtige Voraussetzungen in der Erforschung der Rolle von LGR5 für die kolorektale Karzinogenese.

# Zusammenfassung

Obwohl die Metastasierung die häufigste krankheitsbedingte Todesursache beim kolorektalen Karzinom ist und dieses zu den am besten untersuchten Tumortypen gehört, zeigen bisherige Therapien keine überzeugende Effizienz. Bei der Entstehung kolorektaler Dysplasien ist in der Majorität der Fälle eine Deregulation des kanonischen WNT-Signalwegs der initiierende Effekt (*gatekeeper*). Der kanonische WNT-Signalweg reguliert vor allem das Tumorstammzellkompartiment kolorektaler Karzinome durch die transkriptionelle Expression der Gruppe der  $\beta$ -Catenin Zielgene, unter ihnen LGR5. Tumorstammzellen erneuern sich analog zu den adulten Stammzellen selbst (*self renewal*) und differenzieren umgekehrt in jedes Differenzierungsstadium der Zellen eines Tumors. Mit ihrer ausgeprägten Fähigkeit zu Migration und Invasion sind sie für Repopulation und Progression eines Tumors verantwortlich. Der Transmembran-Rezeptor LGR5 gilt dabei als Marker dieser kolorektalen Tumorstammzellen, weil er stark in adulten Stammzellen des Dünndarms der Maus exprimiert wird. Nach Bindung von R-Spondin1 potenziert LGR5 die Aktivität des WNT-Signalwegs, sodass das R-Spo1/ LGR5-System als WNT-Agonist angesehen werden kann. Die LGR5 Expression korreliert mit Lymphgefäßinvasion und -metastasierung sowie mit dem Tumorstadium. Aufgrund dieser Erkenntnisse vermuten zahlreiche bisherige Studien eine direkte funktionelle Beteiligung von LGR5 an der Regulierung der *stemness* kolorektaler Tumorstammzellen.

Um diese These zu prüfen, wurde deshalb in dieser Arbeit der Einfluss von LGR5 auf die tumorigenen Fähigkeiten von Tumorzellen untersucht. Hierzu wurde eine LGR5-spezifische RNA-Interferenz (RNAi) durchgeführt, die zu einer deutlichen Expressionsminderung auf RNA-Ebene führte. Es zeigte sich, dass weder Migration, Invasion noch adhäsionsunabhängiges Wachstum durch die Ablation der LGR5-Expression in den kultivierten Tumorzellen beeinflusst werden. Eine funktionelle Regulierung der *cancer stemness* scheint daher nicht allein durch LGR5, sondern eher nach Aktivierung durch den WNT-Agonisten R-Spondin1 (R-Spo1) zu erfolgen.

## Quick-Start Protocol

### RNeasy® Mini Kit, Part 1

The RNeasy Mini Kit (cat. nos. 74104 and 74106) can be stored at room temperature (15–25°C) for at least 9 months.

For more information, additional and more detailed protocols, and safety information, please refer to the RNeasy Mini Handbook, which can be found at [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks).

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact).

#### Notes before starting

- If purifying RNA from cell lines rich in RNases, or tissue, add either 10 µl β-mercaptoethanol (β-ME), or 20 µl 2 M dithiothreitol (DTT)\* to 1 ml Buffer RLT. Buffer RLT with β-ME or DTT can be stored at room temperature for up to 1 month.
  - Add 4 volumes of ethanol (96–100%) to Buffer RPE for a working solution.
  - Remove RNAlater®-stabilized tissue from the reagent using forceps.
  - For RNeasy Protect Mini Kit (cat. nos. 74124 and 74126), please start with the Quick-Start Protocol RNAlater RNA Stabilization Reagent, RNAlater TissueProtect Tubes, and RNeasy Protect Kits.
- \* This option not included for cells in handbook; handbook to be updated.

1. **Cells:** Harvest a maximum of  $1 \times 10^7$  cells, as a cell pellet or by direct lysis in the vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 1).  
**Tissues:** Do not use more than 30 mg tissue. Disrupt the tissue and homogenize the lysate in the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 1). Centrifuge the lysate for 3 min at maximum speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and use it in step 2.
2. Add 1 volume of 70% ethanol to the lysate, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 3.
3. Transfer up to 700 µl of the sample, including any precipitate, to an RNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$ . Discard the flow-through.

**Optional:** For DNase digestion, follow steps 1–4 of “On-column DNase digestion” in Quick-Start Protocol RNeasy Mini Kit, Part 2.

4. Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$ . Discard the flow-through.
5. Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$ . Discard the flow-through.
6. Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$ .

**Optional:** Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge at full speed for 1 min to dry the membrane.

7. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid, and centrifuge for 1 min at  $\geq 8000 \times g$  to elute the RNA.
8. If the expected RNA yield is  $> 30 \mu\text{g}$ , repeat step 7 using another 30–50 µl of RNase-free water, or using the eluate from step 7 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 7.

**Table 1. Volumes of Buffer RLT for sample disruption and homogenization**

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT	Disruption and homogenization
Animal cells	$< 5 \times 10^6$	$< 6 \text{ cm}$	350 µl	Add Buffer RLT, vortex ( $\leq 1 \times 10^6$ cells); or use QIAshredder, TissueRuptor®, or needle and syringe
Animal tissues	$< 20 \text{ mg}$	–	350 µl*	TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder or needle and syringe
	$\leq 30 \text{ mg}$	–	600 µl	

\* Use 600 µl Buffer RLT for tissues stabilized in RNAlater, or for difficult-to-lyse tissues.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.



## 7 Anhang

### I. Quickstart Handbuch RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

II. Quickstart Handbuch RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase Kit  
(Fermentas)

**Protocol for First Strand cDNA Synthesis**

The following protocol is optimized to generate first-strand cDNA for use in two-step RT-PCR.

Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

1. Add into sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA <i>or</i> poly(A) RNA <i>or</i> specific RNA	1 pg - 5 µg  0.1 pg - 500 ng  0.01 pg - 500 ng
Primer	Oligo(dT) <sub>18</sub> (#S0131) <i>or</i> Random Hexamer (#S0141) <i>or</i> gene-specific primer	1 µl (100 pmol)  1 µl (100 pmol)  1.5-20 pmol
dNTP Mix, 10 mM each (#R0191)		1 µl (0.5 mM final concentration)
DEPC-treated Water (#R0601)		to 14.5 µl

2. **Optional:** If the RNA template is GC rich or is known to contain secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min, chill on ice, briefly centrifuge again and place on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X RT Buffer	4 µl
Thermo Scientific Ribolock RNase Inhibitor (#E00381)	0.5 µl (20 u)
RevertAid Premium Reverse Transcriptase	1 µl (200 u)
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>

Mix gently and centrifuge briefly.

4. If an oligo(dT)<sub>18</sub> primer or gene-specific primer is used, incubate for 30 min at 50°C.  
If a random hexamer primer is used, incubate for 10 min at 25°C followed by 30 min at 50°C.  
For transcription of GC rich RNA, the reaction temperature can be increased to 60°C.

5. Terminate the reaction by heating at 85°C for 5 minutes.

**Note**

- The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR or stored at -20°C for up to one week. For longer storage, -70°C is recommended. Avoid freeze/thaw cycles of the cDNA.
- Use 2 µl of the reaction mix to perform PCR in a 50 µl volume.

### III. RT-qPCR - Protokolle

**beta-Actin** 97nt 60°C

[NM\\_001101.3](#) x **80**

Roche PM	5	<b>400</b>
H2O	2,78	<b>222,4</b>
A1791 (900nM)	0,09	<b>7,20</b>
A1792 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
#64	0,1	<b>8,00</b>

**HPRT** 102nt 60°C

[NM\\_000194.2](#) x **80**

Roche PM	5	<b>400</b>
H2O	2,72	<b>217,6</b>
A2102 (900nM)	0,09	<b>7,20</b>
A2103 (900nM)	0,09	<b>7,20</b>
#73	0,1	<b>8,00</b>

**ZEB-1** 70nt 60°C

[NM\\_001128128.2](#) x **96**

Roche PM	5	<b>480</b>
H2O	2,84	<b>272,6</b>
A1272 (300nM)	0,03	<b>2,88</b>
A1273 (300nM)	0,03	<b>2,88</b>
#3	0,1	<b>9,60</b>

**YWHAZ** 130nt 60°C

[NM\\_001135699.1](#) x **80**

Roche PM	5	<b>400</b>
H2O	2,84	<b>227,2</b>
A2517 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
A2518 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
#30	0,1	<b>8,00</b>

**GAPDH** 66nt 60°C

[NM\\_002046.3](#) x **110**

Roche PM	5	<b>550</b>
H2O	2,84	<b>312,4</b>
A2023 (300nM)	0,03	<b>3,30</b>
A2024 (300nM)	0,03	<b>3,30</b>
#60	0,1	<b>11,00</b>

**CD44** 90nt 60°C

[NM\\_000610.3](#) x **80**

Roche PM	5	<b>400</b>
H2O	2,78	<b>222,4</b>
A1344 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
A1345 (900nM)	0,09	<b>7,20</b>
#39	0,1	<b>8,00</b>

**CD133** 77nt 60°C

[NM\\_001145847.1](#) x **95**

Roche PM	5	<b>475</b>
H2O	2,84	<b>269,8</b>
A1533 (300nM)	0,03	<b>2,85</b>
A1534 (300nM)	0,03	<b>2,85</b>
#83	0,1	<b>9,50</b>

**CD166 (ALCAM)** 91nt 60°C

[NM\\_001627.2](#) x **95**

Roche PM	5	<b>475</b>
H2O	2,78	<b>264,1</b>
A1678 (300nM)	0,03	<b>2,85</b>
A1679 (900nM)	0,09	<b>8,55</b>
#6	0,1	<b>9,50</b>

**ASCL2** 63nt 60°C

[NM\\_005170.2](#) x **156**

Roche PM	5	<b>780</b>
H2O	2,78	<b>433,7</b>
A2245 (300nM)	0,03	<b>4,68</b>
A2246 (900nM)	0,09	<b>14,04</b>
#55	0,1	<b>15,60</b>

**OLFM4** 74nt 60°C

[NM\\_006418.4](#) x **90**

Roche PM	5	<b>450</b>
H2O	2,72	<b>244,8</b>
A2243 (900nM)	0,09	<b>8,10</b>
A2244 (900nM)	0,09	<b>8,10</b>
#24	0,1	<b>9,00</b>

**LGR5** 74nt 60°C

[NM\\_003667.2](#) x **80**

Roche PM	5	<b>400</b>
H2O	2,84	<b>227,2</b>
A2330 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
A2331 (300nM)	0,03	<b>2,40</b>
#25	0,1	<b>8,00</b>

**E-Cadherin** 72nt 60°C

x **96**

Roche PM	5	<b>480</b>
H2O	2,81	<b>269,8</b>
A1280 (300nM)	0,03	<b>2,88</b>
A1281 (600nM)	0,06	<b>5,76</b>
#35	0,1	<b>9,60</b>

**Vimentin** 104nt 60°C

[NM\\_003380.3](#) x **96**

Roche PM	5	<b>480</b>
H2O	2,75	<b>264,0</b>
A1488 (900nM)	0,09	<b>8,64</b>
A1489 (600nM)	0,06	<b>5,76</b>
#13	0,1	<b>9,60</b>

## 8 **Abbildungsverzeichnis**

- ABB. 1 - **MODELL DER METASTASIERUNG.** - 2
- ABB. 2 - **PHÄNOTYPISCHE HETEROGENITÄT IN CRC UND METASTASEN.** - 2
- ABB. 3 - **KLONALES EVOLUTIONSMODELL UND TUMORSTAMMZELLMODELL.** - 4
- ABB. 4 - **PLASTIZITÄT KOLOREKTALER TUMORZELLEN (CRC) ALS VORAUSSETZUNG FÜR METASTASIERUNG.** - 7
- ABB. 5 - **DER WNT-SIGNALWEG.** - 10
- ABB. 6 - **DER WNT/  $\beta$ -CATENIN SIGNALWEG REGULIERT UND KONTROLLIERT DIE MALIGNEN PROGRESSION IN CRC.** -12
- ABB. 7 - **HALLMARKS OF CANCER.** - 14
- ABB. 8 - **AUFBAU VON MIGRATIONSEXPERIMENTEN DURCH WOUND-HEALING ASSAYS UNTER EINSATZ VON *IBIDI*-KAMMERN (IBIDI 2014).** - 28
- ABB. 9 - **AUSWERTUNG EINES WOUND-HEALING ASSAYS.** - 29
- ABB. 10 - **PRINZIP DER BOYDEN CHAMBER.** - 29
- ABB. 11 - **DIGITALE FOTOGRAFIE DER RÜCKSEITE EINES *INSERTS* EINER BOYDENKAMMER NACH KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG.** - 30
- ABB. 12 - **AUSWERTUNGSBEISPIEL DER KOLONIEN IM TRANSFORMATIONS-/METHYLCELLULOSE-ASSAY AM BEISPIEL VON DLD ZELLEN.** - 31
- ABB. 13 - **RELATIVE LGR5-EXPRESSION KOLOREKTALER ZELLINIEN.** - 32
- ABB. 14 - **LGR5 SHRNA2 UND SHRNA5 REDUZIEREN DIE ENDOGENE LGR5 EXPRESSION IN DEN KULTIVIERTEN KOLOREKTALEN ZELLINIEN DLD1, T84, SW403 UND LOVO AM EFFEKTIVSTEN.** - 33
- ABB. 15 - **DIE MINDEREXPRESSION VON LGR5 BEEINFLUSST WEDER DIE EXPRESSION KOLOREKTALER TUMORSTAMMZELL- NOCH EMT-MARKER.** - 35
- ABB. 16 - **VERLUST VON LGR5-EXPRESSION FÜHRT ZU KEINER ÄNDERUNG DER MIGRATIONSFÄHIGKEIT KOLOREKTALER TUMORZELLEN.** - 36
- ABB. 17 - **VERLUST VON LGR5-EXPRESSION FÜHRT ZU KEINER ÄNDERUNG DER INVASIONSFÄHIGKEIT KOLOREKTALER TUMORZELLEN.** - 37
- ABB. 18 - **VERLUST VON LGR5-EXPRESSION FÜHRT ZU KEINER ÄNDERUNG VON ADHÄSIONSUNABHÄNGIGEM WACHSTUM IN KOLOREKTALEN TUMORZELLEN.** - 38
- ABB. 19 – **VERGLEICH DER KOLONIEN UNTERSCHIEDLICHER KLONE VON DLD ZELLEN IM TRANSFORMATIONS-/METHYLCELLULOSE-ASSAY.** - 39
- ABB. 20 – **DOSIS-MODELL ZUR ERKLÄRUNG DER EFFEKTE VON R-SPONDIN1 BEI LIMITIERENDEN MENGEN AN LGR5 REZEPTOR.** - 43

## 9 Tabellenverzeichnis

TAB. 1 - PRIMERSEQUENZEN FÜR DIE QUANTITATIVE PCR (QPCR). - 23

TAB. 2 - CHARAKTERISTIKA DER EINGESETZTEN KOLOREKTALE TUMORZELLINIEN. - 24

TAB. 3 - SEQUENZINFORMATIONEN ZU DEN EINGESETZTEN shRNAs. - 26

## 10 Referenzen

- Ahuja N, Mohan AL, Li Q, et al:** Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* 57:3370-4, **1997**
- Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al:** Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469:356-61, **2011**
- ATCC:** Cell Lines. 2014, March 22 2014, from <http://www.lgcstandards-atcc.org/>.
- Baccelli I, Trumpp A:** The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of cell biology* 198:281-93, **2012**
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al:** Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457:608-11, **2009**
- Barker N, van de Wetering M, Clevers H:** The intestinal stem cell. *Genes & development* 22:1856-64, **2008**
- Barker N, van de Wetering M, Clevers H:** The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22:1856-64, **2008**
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al:** Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449:1003-7, **2007**
- Bartlett DL, Chu E:** Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology* 26:266-75, **2012**
- Becker L, Huang Q, Mashimo H:** Immunostaining of *Lgr5*, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal* 8:1168-76, **2008**
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, et al:** Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer research* 55:1811-6, **1995**
- Beiter K, Hiendlmeyer E, Brabletz T, et al:** beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene* 24:8200-4, **2005**
- Bienz M, Clevers H:** Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103:311-20, **2000**
- Blasco MA:** Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair. *Eur J Cancer* 38:2222-8., **2002**
- Bonnet D, Dick JE:** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3:730-7, **1997**
- Brabletz T, Jung A, Dag S, et al:** beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155:1033-8., **1999**
- Brabletz T, Jung A, Dag S, et al:** beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology* 155:1033-8, **1999**

**Brabletz T, Jung A, Reu S, et al:** Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10356-61., **2001**

**Brabletz T, Jung A, Reu S, et al:** Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10356-61, **2001**

**Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al:** Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5:744-9, **2005**

**Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, et al:** Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development* 18:2225-30, **2004**

**Burkert J, Wright NA, Alison MR:** Stem cells and cancer: an intimate relationship. *The Journal of pathology* 209:287-97, **2006**

**Cao Z, Ding BS, Guo P, et al:** Angiocrine factors deployed by tumor vascular niche induce B cell lymphoma invasiveness and chemoresistance. *Cancer cell* 25:350-65, **2014**

**Carmon KS, Gong X, Lin Q, et al:** R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11452-7, **2011**

**Catalano V, Di Franco S, Iovino F, et al:** CD133 as a target for colon cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 16:259-67, **2012**

**Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al:** Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406:532-5, **2000**

**Clevers H:** Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-80, **2006**

**D. Hölzel, R. Eckel, Engel J:** Metastasierung beim kolorektalen Karzinom. *Der Chirurg* 80:331-340, **2009**

**Dalerba P, Cho RW, Clarke MF:** Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine* 58:267-84, **2007**

**Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, et al:** Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell* 9:357-65, **2011**

**Dietvorst MH, Eskens FA:** Current and Novel Treatment Options for Metastatic Colorectal Cancer: Emphasis on Aflibercept. *Biologics in therapy* 3:25-33, **2013**

**DSMZ:** T84 - Cell Line Information. Nov 17, 2012, from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-248&Template=cellBiology>.

**Du L, Wang H, He L, et al:** CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:6751-60, **2008**

- Easwaran V, Lee SH, Inge L, et al:** beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res* 63:3145-53, **2003**
- Essers MA, Trumpp A:** Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Molecular oncology* 4:443-50, **2010**
- Fan XS, Wu HY, Yu HP, et al:** Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *International journal of colorectal disease* 25:583-90, **2010**
- Fodde R, Smits R:** Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends in molecular medicine* 7:369-73, **2001**
- Fukuda S, Pelus LM:** Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular cancer therapeutics* 5:1087-98, **2006**
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al:** Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* 366:883-92, **2012**
- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, et al:** Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 63:2658-64, **2003**
- Gradl D, Kuhl M, Wedlich D:** The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* 19:5576-87, **1999**
- Grover PK, Hardingham JE, Cummins AG:** Stem cell marker olfactomedin 4: critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 29:761-75, **2010**
- Hahn WC, Weinberg RA:** Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature reviews. Cancer* 2:331-41, **2002**
- Hanahan D, Weinberg RA:** The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, **2000**
- Hanahan D, Weinberg RA:** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74, **2011**
- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, et al:** Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *The EMBO journal* 18:5931-42, **1999**
- Hayflick L, Moorhead PS:** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25:585-621, **1961**
- He TC, Sparks AB, Rago C, et al:** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-12, **1998**
- Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, et al:** Telomere length in early life predicts lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:1743-8, **2012**
- Hiddemann CRB:** Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie (ed 2. Auflage), Wolfgang Hiddemann, Claus R. Bartram, 2010 pp. 9
- Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, et al:**  $\beta$ -catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res* 64:1209-14, **2004**

**Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, et al:** Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer research* 64:1209-14, **2004**

**Hlubek F, Jung A, Kotzor N, et al:** Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res* 61:8089-93., **2001**

**Hlubek F, Spaderna S, Jung A, et al:** Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 108:321-6, **2004**

**Hlubek F, Spaderna S, Jung A, et al:** Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 108:321-6, **2004**

**Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, et al:** Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* 336:1549-54, **2012**

**Horst D, Kriegl L, Engel J, et al:** CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *Eur J Cancer* 45:2034-40, **2009**

**Horst D, Kriegl L, Engel J, et al:** CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 99:1285-9, **2008**

**Horst D, Kriegl L, Engel J, et al:** Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 27:844-50, **2009**

**Horst D, Reu S, Kriegl L, et al:** The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer* 115:2063-70, **2009**

**Horst D, Scheel SK, Liebmann S, et al:** The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *The Journal of pathology* 219:427-34, **2009**

**Hsu SY, Kudo M, Chen T, et al:** The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Molecular endocrinology* 14:1257-71, **2000**

**Hu X, Ghisolfi L, Keates AC, et al:** Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell cycle* 11:2691-8, **2012**

**Hynda K. Kleinman KJ:** *Current Protocols - Invasion Assays*. 2001, 05.07.12, from

<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refld-cb1202.html>.

**ibidi:** Culture-Insert Family. 2014, 2014-06-02, from

<http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-Removable-Chambers/Culture-Insert-Family>.

**Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, et al:** Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10330-4, **1997**

- Jaitner S, Reiche JA, Schaffauer AJ, et al:** Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of beta-catenin in human colorectal tumors. *Cell Cycle* 11, **2012**
- Jaitner S, Reiche JA, Schaffauer AJ, et al:** Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of beta-catenin in human colorectal tumors. *Cell cycle* 11:3331-8, **2012**
- Jiang L, Li J, Song L:** Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41:527-34, **2009**
- Juliano RL, Ling V:** A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* 455:152-62, **1976**
- Jung A, Schrauder M, Oswald U, et al:** The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 159:1613-7., **2001**
- Kalluri R, Weinberg RA:** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119:1420-8, **2009**
- Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, et al:** Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem cells* 30:2378-86, **2012**
- Kim KA, Kakitani M, Zhao J, et al:** Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309:1256-9, **2005**
- Kim PJ, Plescia J, Clevers H, et al:** Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 362:205-9, **2003**
- Kinzler KW, Vogelstein B:** The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* 10:634-42, **1990**
- Kinzler KW, Vogelstein B:** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-70, **1996**
- Kinzler KW, Vogelstein B:** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-70., **1996**
- Klein CA:** Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9:302-12, **2009**
- Kleinman HK, Jacob K:** Invasion assays. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.] Chapter 12:Unit 12 2*, **2001**
- Kleist B, Xu L, Li G, et al:** Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 4:327-35, **2011**
- Korinek V, Barker N, Moerer P, et al:** Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics* 19:379-83, **1998**
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al:** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 275:1784-7, **1997**
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, et al:** Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *The Journal of cell biology* 148:615-24, **2000**

**Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, et al:** Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:266-71, **2004**

**Li CW, Xia W, Huo L, et al:** Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer research* 72:1290-300, **2012**

**Li P, Zhou C, Xu L, et al:** Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *International journal of medical sciences* 10:399-407, **2013**

**Liotta LA, Kohn EC:** The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375-9, **2001**

**Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al:** Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18115-20, **2010**

**Loh ED, Broussard SR, Liu Q, et al:** Chromosomal localization of GPR48, a novel glycoprotein hormone receptor like GPCR, in human and mouse with radiation hybrid and interspecific backcross mapping. *Cytogenetics and cell genetics* 89:2-5, **2000**

**Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al:** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-15, **2008**

**Mann B, Gelos M, Siedow A, et al:** Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1603-8, **1999**

**Mann B, Gelos M, Siedow A, et al:** Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1603-8, **1999**

**McLoughlin JM, Jensen EH, Malafa M:** Resection of colorectal liver metastases: current perspectives. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 13:32-41, **2006**

**Mizukami Y, Li J, Zhang X, et al:** Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer research* 64:1765-72, **2004**

**Nakata S, Phillips E, Goidts V:** Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer management and research* 6:171-80, **2014**

**O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al:** A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-10, **2007**

**O'Connor R:** The pharmacology of cancer resistance. *Anticancer research* 27:1267-72, **2007**

**Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, et al:** CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 55:1000-6, **2006**

**Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ:** Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3:895-902, **2003**

**Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA:** Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *Journal of the National Cancer Institute* 46:411-22, **1971**

**Pascau J, Mateos, JM:** *Image Processing with ImageJ*, PACKT PUBLISHING, 2013

**PHE:** Culture Collections. 2014, March 22 2014, from <http://www.phe-culturecollections.org.uk/>.

**Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al:** Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* 17:1709-13, **2003**

**Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al:** Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17:1709-13, **2003**

**Pirila E, Sharabi A, Salo T, et al:** Matrix metalloproteinases process the laminin-5 gamma 2-chain and regulate epithelial cell migration. *Biochemical and biophysical research communications* 303:1012-7, **2003**

**Polyak K, Weinberg RA:** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews. Cancer* 9:265-73, **2009**

**Rawlings ND:** *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Pr Inc, 2012 pp. 791

**Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al:** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-11, **2001**

**Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al:** Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445:111-5, **2007**

**Ricci-Vitiani L, Pagliuca A, Palio E, et al:** Colon cancer stem cells. *Gut* 57:538-48, **2008**

**RKI:** krebdaten.de. 2012, 16/02/2013, 2013, from [http://www.krebdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html).

**Romagnolo B, Berrebi D, Saadi-Keddoucci S, et al:** Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin. *Cancer research* 59:3875-9, **1999**

**Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, et al:** Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409:633-7, **2001**

**Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, et al:** Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *The EMBO journal* 22:1101-13, **2003**

**Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, et al:** APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits".

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:3352-7, **2000**

**Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, et al:** A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature medicine* 19:619-25, **2013**

**Saigusa S, Inoue Y, Tanaka K, et al:** Significant correlation between LKB1 and LGR5 gene expression and the association with poor recurrence-free survival in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 139:131-8, **2013**

**Sanchez-Tillo E, de Barrios O, Siles L, et al:** beta-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:19204-9, **2011**

**Sangiorgi E, Capecchi MR:** Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature genetics* 40:915-20, **2008**

**Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, et al:** Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446:676-9, **2007**

**Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, et al:** Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & development* 18:1385-90, **2004**

**Savagner P:** Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23:912-23, **2001**

**Scheel SK:** beta-Catenin in der kolorektalen Karzinogenese, Pathologisches Institut der LMU. München, LMU München, **2010**

**Schuijers J, Clevers H:** Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *Embo Journal* 31: 2685–2696m **2012**

**Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al:** Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell*, **2012**

**Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al:** Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152:25-38, **2013**

**Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al:** The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5522-7, **1999**

**Smits R, Kielman MF, Breukel C, et al:** Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes & development* 13:1309-21, **1999**

**Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, et al:** The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 68:537-44, **2008**

**Tang DG:** Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell research* 22:457-72, **2012**

- Tetsu O, McCormick F:** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-6, **1999**
- Thiery JP:** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 2:442-54, **2002**
- Tian H, Biehs B, Warming S, et al:** A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478:255-9, **2011**
- Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, et al:** Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell* 1:389-402, **2007**
- Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, et al:** Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer science* 101:1731-7, **2010**
- Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al:** Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 40:127-32., **2002**
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al:** The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111:241-50, **2002**
- van der Flier LG, Haegerbarth A, Stange DE, et al:** OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 137:15-7, **2009**
- Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, et al:** The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132:628-32, **2007**
- van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, et al:** Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 136:903-12, **2009**
- van der Horst G, Bos L, van der Pluijm G:** Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Molecular cancer research : MCR* 10:995-1009, **2012**
- van der Pluijm G:** Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone* 48:37-43, **2011**
- Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, et al:** Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology* 12:468-76, **2010**
- Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, et al:** Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 12:468-76, **2010**
- Visvader JE, Lindeman GJ:** Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell stem cell* 10:717-28, **2012**
- Vogelstein B, Kinzler KW:** The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG* 9:138-41, **1993**
- Walker F, Zhang HH, Odorizzi A, et al:** LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PloS one* 6:e22733, **2011**

- Wassermann S, Scheel SK, Hiendlmeyer E, et al:** p16INK4a is a beta-catenin target gene and indicates low survival in human colorectal tumors. *Gastroenterology* 136:196-205 e2, **2009**
- Weinberg RA:** *The Biology Of Cancer*, Garland Science, Taylor&Francis Group, LLC, 2007, pp 591
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, et al:** Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154:515-23, **1999**
- Wu XS, Xi HQ, Chen L:** Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol* 10:244, **2012**
- Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, et al:** Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 60:4761-6, **2000**
- Zeindl-Eberhart E, Brandl L, Liebmann S, et al:** Epithelial-mesenchymal transition induces endoplasmic-reticulum-stress response in human colorectal tumor cells. *PLoS One* 9:e87386, **2014**
- Zeisberg M, Neilson EG:** Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* 119:1429-37, **2009**
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, et al:** Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 61:8664-7, **2001**
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC:** Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research* 61:6050-4, **2001**
- Zhang X, Nie D, Chakrabarty S:** Growth factors in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience* 15:151-65, **2010**

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Blumrath, Kira Christine

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Der Stammzellmarker LGR5 (Leucine-Rich Repeat G-protein Coupled Receptor 5) übernimmt keine tumortreibende Funktion in der kolorektalen Karzinogenese.*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.07.2014

---

Doktorandin