

# BioFokus

---

## Genetisch modifizierte Mausmodelle in der Krebsforschung

Prof. em. Dr. Gerhard Christofori  
Département Biomedizin, Universität Basel

---

## Modèles murins génétiquement modifiés dans la recherche sur le cancer

Prof. ém. Dr Gerhard Christofori  
Département de biomédecine, Université de Bâle

Forschung für Leben

  
[www.forschung-leben.ch](http://www.forschung-leben.ch)

# Zusammenfassung

## Résumé

---

### Worum es geht

Krebs ist leider noch immer eine der tödlichsten Erkrankungen des Menschen und von Tieren. Die intensive biomedizinische Forschung der letzten Jahrzehnte hat zwar die wichtigsten genetischen und molekularen Veränderungen der Krebsentstehung identifizieren können, jedoch erschwert die Vielzahl dieser Veränderungen und ihrer Kombinationen in den meisten Fällen noch eine effiziente Therapie. Die Entwicklung einer bösartigen Krebserkrankung beruht auf Vorgängen innerhalb der Krebszellen, wie z. B. Genmutationen die zu unkontrollierter Zellteilung führen, wie auch auf der Interaktion der Krebszellen mit der Umgebung im Körper. Um diese zellulären und molekularen Prozesse in den verschiedenen Stufen der Krebsentstehung zu untersuchen und darauf basierend neuartige Therapien zu entwickeln, bedarf es daher experimenteller Studien in einem intakten Organismus mit funktionellen Organen, durchbluteten Gefäßen und aktivem Immunsystem. Die Entwicklung von dreidimensionalen Kultursystemen wird derzeit intensiv vorangetrieben, jedoch können sie die komplexe Situation im menschlichen Organismus (noch) nicht ausreichend nachbilden. Genetisch modifizierte Mäuse bieten die einzigartige Möglichkeit, die Mechanismen der zellulären und molekularen Ereignisse der Krebsentwicklung in Patient\*innen zu rekapitulieren und besser zu verstehen. In diesem Artikel werden Technologien vorgestellt, mit denen genetisch modifizierte Mauslinien hergestellt werden, die als Modelle für spezifische Krebserkrankungen in der Forschung eingesetzt werden. Anhand einiger ausgewählter Beispiele wird erklärt, wie genetisch veränderte (sogenannte transgene) Mäuse dazu beigetragen haben, den ursächlichen Beitrag von Genetik, Epigenetik und Umwelt bei der Krebsentwicklung aufzuzeigen, und damit die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze zu ermöglichen.

### De quoi s'agit-il?

Le cancer reste hélas l'une des maladies les plus mortelles de l'être humain et de l'animal. Les travaux de recherche biomédicale intensifs des dernières décennies ont permis d'identifier les principales modifications génétiques et moléculaires à l'origine du cancer, mais le grand nombre de ces modifications et de leurs combinaisons limite encore souvent l'efficacité des traitements. La genèse de tumeurs malignes repose sur des processus qui se déroulent au sein des cellules cancéreuses, p. ex. des mutations génétiques qui entraînent une division cellulaire incontrôlée, ainsi que sur l'interaction des cellules cancéreuses avec leur environnement dans l'organisme. Pour étudier ces processus cellulaires et moléculaires aux différentes étapes de la genèse du cancer, puis développer sur cette base des traitements entièrement nouveaux, on a donc besoin d'études expérimentales dans un organisme intact, doté d'organes fonctionnels, de vaisseaux sanguins irrigués et d'un système immunitaire actif. On travaille actuellement avec acharnement au développement de systèmes cellulaires tridimensionnels, mais ceux-ci ne peuvent pas (encore) reproduire suffisamment fidèlement la situation complexe rencontrée dans l'organisme humain. Les souris génétiquement modifiées offrent une possibilité unique de récapituler et mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la genèse du cancer chez les patient-e-s. Cet article présente des technologies servant à créer des lignées murines génétiquement modifiées qui sont utilisées dans la recherche comme modèles pour différents cancers spécifiques. À l'aide de quelques exemples, il explique comment les souris génétiquement modifiées (dites transgéniques) ont contribué à révéler le rôle causal de la génétique, de l'épigénétique et de l'environnement dans la genèse du cancer et donc à permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées.

---

# Genetisch modifizierte Mausmodelle in der Krebsforschung

## Inhaltsverzeichnis

• <b>Einleitung</b>	<b>3</b>
• <b>Transgene Technologien</b>	<b>4</b>
• <b>Die Rekapitulation von humanem Krebs in Mausmodellen</b>	<b>6</b>
• <i>Lungenkrebs (Lungenadenokarzinom)</i>	6
• <i>Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreasadenokarzinom)</i>	8
• <i>Darmkrebs (Kolorektales Karzinom)</i>	8
• <i>Melanom</i>	8
• <i>Blutkrebs</i>	9
• <i>Neuartige Bildgebung entwickelt in Mausmodellen</i>	9
• <b>Schlussfolgerungen</b>	<b>10</b>
• <b>Referenzen</b>	<b>10</b>

## Einleitung

Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte hat gezeigt, dass bösartige Krebserkrankungen in mehreren Schritten entstehen, an denen eine Vielzahl von genetischen (Genmutationen) und epigenetischen (Änderungen der Genaktivitäten) Ereignissen beteiligt sind. Wir haben jedoch auch gelernt, dass die Entstehung und das Fortschreiten einer tödlichen Krebserkrankung, nicht ausschliesslich von den Krebszellen selbst bestimmt wird. Vielmehr sind es auch die Wechselwirkungen des Tumors mit gesunden Zellen innerhalb eines Organs, z. B. die Versorgung des Tumors mit Blutgefässen, der Einfluss von Immunzellen, sowie metabolische Veränderungen des gesamten Organismus der Patient\*innen, die eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen 1. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist das molekulare und zelluläre Bild der Krebsentstehung komplexer geworden. Dieser Artikel soll zeigen wie und warum transgene Maus-

modelle zum Verständnis der Krankheit Krebs und der Entwicklung neuer Therapieansätze einen wichtigen Beitrag geleistet haben und zukünftig leisten werden.

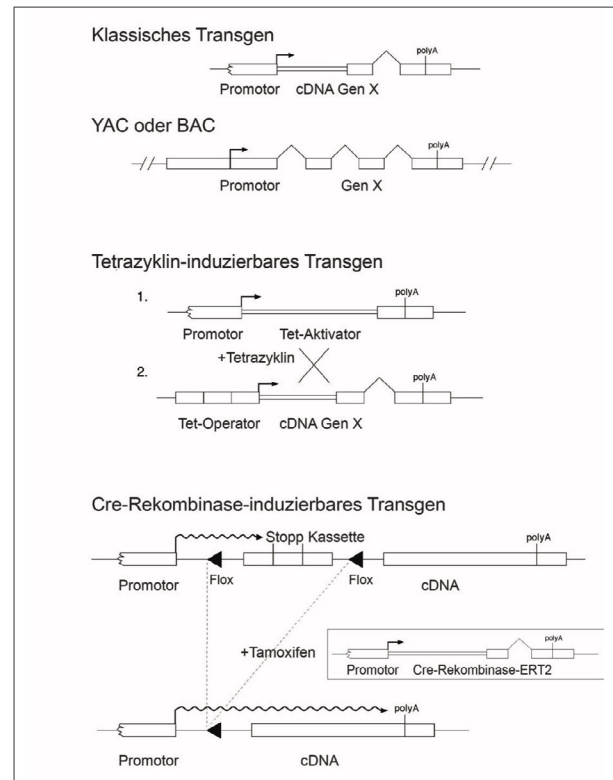
Über die tatsächlichen Ursachen und Mechanismen der Krebsentstehung in Patient\*innen können wir nur spekulieren, weil sich Experimente mit Menschen verbieten. Deswegen sind Tiermodelle derzeit alternativlos für unser Verständnis der komplexen Prozesse, die an der Entstehung von bösartigem Krebs beteiligt sind. Mit Hilfe von geeigneten Tiermodellen können insbesondere die derzeit wichtigsten Herausforderungen der Krebsforschung angegangen werden: Nämlich wie Krebszellen in Lymphgefässe und die Blutbahn einwandern und von dort aus in andere Organe streuen, um dort Tochtergeschwulste (Metastasen) auszubilden. Wir wissen derzeit auch nur ansatzweise warum manche Krebszellen jahrelang versteckt ausharren können ohne sich zu teilen, bevor sie wieder als neuer Tumor auswachsen, wie Krebszellen Resistenz gegen Therapien entwickeln, und wie Krebszellen der Überwachung durch das Immunsystem entkommen. Besonders die Aufklärung wie und bei welchen Patient\*innen die neuesten Methoden der Immuntherapie von Krebs angewandt werden sollen, stellt eine klinische-relevante Forschung dar, die die Nutzung von Tiermodellen mit intaktem oder genetisch verändertem Immunsystem unabdingbar macht.

Um Krebs im Tiermodell zu rekapitulieren werden verschiedene experimentelle Ansätze angewandt, wie etwa die Behandlung mit kreberregenden Substanzen, die Transplantation von Tumorzellen aus Patient\*innen in Mäuse, und die genetische Manipulation des Mausgenoms. Natürlich werfen grundlegende Unterschiede in Anatomie, Physiologie und Biochemie zwischen Mäusen und Menschen eine Reihe von Fragen zur Gleichsetzung der Krebsentwicklung in der Maus und im Menschen auf. Jedoch hat die technologische Entwicklung der letzten Jahre eine ziemlich detailgetreue Nachbildung der genetischen Ereignisse, wie sie in Patient\*innen gefunden werden, in der Maus erlaubt.

Auch hat die Erfahrung der letzten Jahre gezeigt, dass die molekularen Prozesse der Krebsentstehung zwischen Maus und Mensch vergleichbar sind. Daher stellen Mausmodelle einen wichtigen und wertvollen Ansatz zum Verständnis der molekularen Prinzipien der mehrstufigen Krebsentstehung dar<sup>2,3</sup>. Mit der Kenntnis der molekularen und zellulären Veränderungen, die dem bösartigen Verlauf einer Krebserkrankung zugrunde liegen, können dann passende Therapien entwickelt und getestet werden, die letztlich den Patient\*innen zu Gute kommen, deren Tumore eben diese Veränderungen aufweisen. Häufig fällt in diesem Zusammenhang der Begriff «personalisierte Medizin».

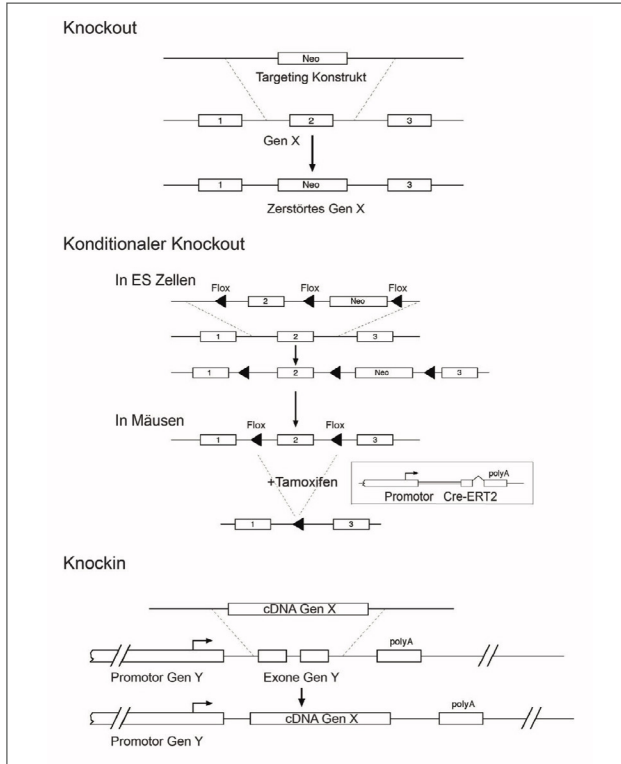
### Transgene Technologien

Die ersten Mausmodelle für Krebs waren Laborinzuchtstämme, die für spezifische Krebsarten anfällig waren, oder in denen durch Behandlung mit Viren oder krebserregenden Substanzen Mutationen erzeugt wurden, die zur Bildung von Krebs führten<sup>4</sup>. Die Manipulation von Genen im Mausgenom, die die Krebsentstehung fördern (sogenannte Proto-Onkogene) oder inhibieren (sogenannte Tumorsuppressorgene), hat es Forschenden ermöglicht, den funktionellen Beitrag von Genen zur Krebsentstehung zu untersuchen (**Abbildungen 1–3**). Im Fachjargon wird der Begriff «Transgene» verwendet für Mäuse in deren Genom ein oder mehrere Gene eingeschleust wurde, während sogenannte «Knockouts» Mäuse sind, bei denen Gene inaktiviert wurden. «Konditionale Transgene oder Knockouts» sind Mäuse, in denen es möglich ist, die Genexpression in bestimmten Geweben und/oder zu bestimmten Zeitpunkten nach Belieben an- oder abzuschalten<sup>4,5</sup>. Diese Ansätze haben wichtige molekulare Einsichten in die Krebsentstehung geliefert. Der nächste Schritt aber war Methoden zu entwickeln, die den präzisen Nachbau der Vielzahl der genetischen Veränderungen, wie sie in individuellen Patient\*innen gefunden werden, im Tier zu ermöglichen.



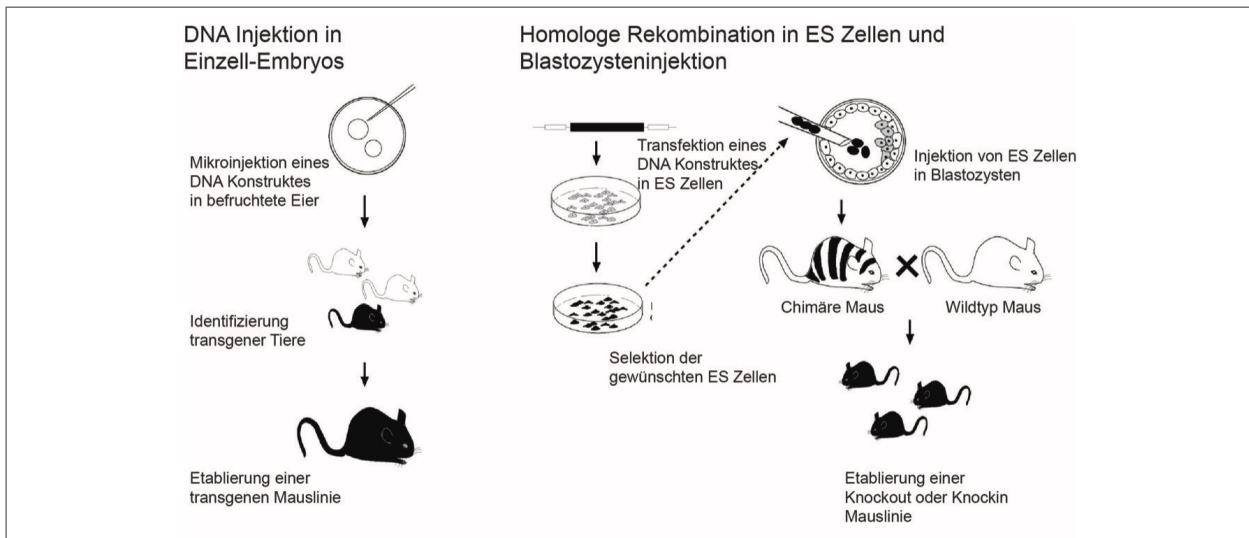
**Abbildung 1: Verschiedene Möglichkeiten Transgene in Mäusen zu exprimieren.**

Im klassischen Ansatz wird ein Transgen unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors zufällig im Mausgenom integriert. Unter Nutzung von Bakterien oder Hefe (Yeast) artifiziellen Chromosomen (BAC oder YAC) wird ein gesamter Chromosomenabschnitt als Transgen in das Mausgenom integriert. Das Tetrazyklin (Tet)-induzierbare System besteht aus der Kombination einer Mauslinie, die den Tet-Aktivator unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors trägt, mit einer Mauslinie, die das gewünschte Transgen unter der Kontrolle des Tet-Operators trägt. Unter Gabe von Tetrazyklin in den doppeltransgenen Tieren bindet der Tet-Aktivator in den Zellen der Wahl an den Tet-Operator und aktiviert die Expression des Transgens. Cre-Rekombinase-induzierte Expression von transgenen wird erreicht durch die Kombination von Mauslinien, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors tragen und von Mauslinien, die eine Stopp Kasette vor dem Transgen tragen, die wiederum von Flox Rekombinationssequenzen flankiert ist. Meist wird eine Version der Cre-Rekombinase verwendet, die mit einer Tamoxifen-bindenden Version des Östrogen Rezeptors fusioniert ist (ERT2). Unter Gabe des Östrogen Analoges Tamoxifen wird die Cre-Rekombinase in den Zellkern transportiert, wo sie die Stopp Kasette vor dem Transgen entfernt und damit das Transgen aktiviert.



**Abbildung 2: Verschiedene Möglichkeiten Gene zu inaktivieren.**

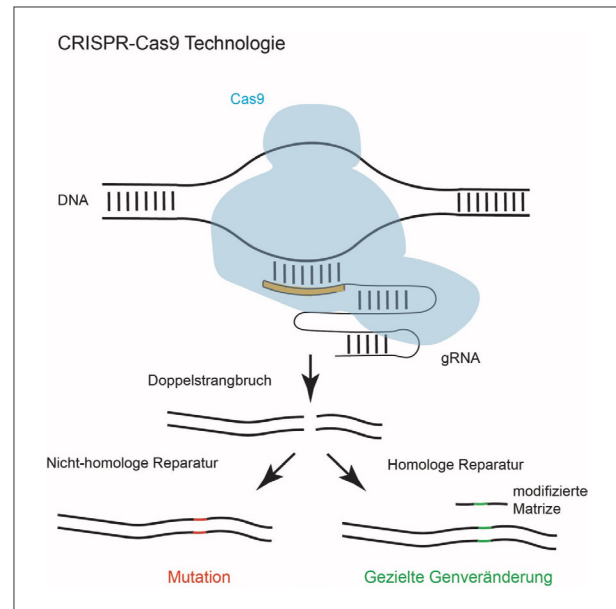
Im konventionellen Knockout wird durch homologe Rekombination mit einem Antibiotikaresistenz (Neo)-tragenden DNA Konstrukt zum Beispiel ein Exon des gewünschten Genes entfernt und dadurch die Funktion des Genprodukts in allen Zellen des Körpers entfernt. Im konditionalen Knockout werden durch homologe Rekombination Flox Rekombinationssequenzen und ein Neomycin (Neo) Selektionsmarker so in das Zielgen integriert, dass durch Cre-Rekombinase zum Beispiel ein Exon und der Neo-Marker entfernt werden kann. Durch Nutzung einer Version der Cre-Rekombinase, die einer Tamoxifen-bindenden Version des Östrogen Rezeptors fusioniert ist (ERT2) wird unter Gabe des Östrogen Analoges Tamoxifen die Cre-Rekombinase in den Zellkern transportiert, wo sie das Exon entfernt und dadurch das Zielgen inaktiviert wird. Für eine Knockin Mauslinie wird ein DNA Konstrukt mit zum Beispiel einer cDNA für das Gen X durch homologe Rekombination in ES Zellen in die kodierende Sequenz eines Genes Y integriert. Dadurch wird die Expression des Genes X unter die Kontrolle des Promotors des Genes Y gestellt. Auch können auf diese Weise mutierte Versionen eines Genes in den eigenen chromosomalen Locus integriert werden.



**Abbildung 3: Verschiedene Ansätze genmodifizierte Mäuse herzustellen.**

Mit der DNA Injektion wird das Transgen als DNA Konstrukt in den männlichen Vorkern von einzelligen befruchteten Eiern injiziert. Das DNA Konstrukt integriert sich in das Erbmateriale an einer zufälligen Stelle in einem Chromosom. Die injizierten Embryos werden dann in die Eileiter von Ammentieren implantiert. Transgen-tragende «Founder»Mäuse werden dann identifiziert, und individuelle stabile transgene Mauslinien werden dann durch Paarung mit Wildtyp Mäusen etabliert. Homologe Rekombination von gewünschten DNA Konstrukten mit dem Zielgen wird üblicherweise in embryonalen Stammzellen (ES) in Zellkultur durchgeführt. Nach Selektion der rekombinierten Zellen mittels eines Selektionsmarkers werden die Zellen in Blastozysten injiziert, die dann in die Gebärmutter von Ammentieren implantiert werden. Es werden zunächst chimäre Tiere geboren, in denen ein Teil der Zellen von der Blastozyste (schwarze Fellfarbe) und ein Teil der Zellen von den ES Zellen (weiße Fellfarbe) abstammen, sichtbar zum Beispiel am gestreiften Fell. Diese Tiere werden dann weiter mit Wildtyp Mäusen verpaart, um homogene Knockout oder Knockin Mauslinien zu etablieren.

Ein Durchbruch in diese Richtung kam mit der Entdeckung des CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) -Cas9 Systems, das in Bakterien als Immunabwehr gegen fremde DNA wirkt<sup>6,7</sup>. Dieses bakterielle Abwehrsystem wurde als gentechnologisches Werkzeug so adaptiert, dass die Erbinformation in Zellen gezielt und effizient verändert werden kann. Letztendlich wurde das CRISPR-Cas9 System zu zwei Komponenten vereinfacht: das Ribonukleoprotein Cas9 erkennt in Kombination mit einer sogenannten guide RNA (gRNA) die gewünschte spezifische DNA Sequenz im Genom und durchtrennt an der ausgewählten Stelle den DNA Doppelstrang (**Abbildung 4**). Doppelstrangbrüche werden in Säugerzellen durch zwei in der Evolution konservierte Mechanismen repariert, der Homologie-basierten Reparatur und der nicht-Homologie-basierten Verbindung der offenen Enden<sup>8-10</sup>. Im letzteren Fall entstehen oft Mutationen, welche die Geninformation zerstören. Im Gegensatz dazu benutzt die Homologie-basierte Reparatur eine DNA-Matrize, um den Doppelstrangbruch korrekt zu schliessen (**Abbildung 4**). Manipulierte DNA-Matrizen können nun dazu genutzt werden, die Erbinformation nach Wunsch zu verändern. So kann z. B. eine Genmutation, wie sie in Tumoren von Patient\*innen gefunden wird, gezielt in das Erbmaterial von Tieren eingebaut werden. Ferner können damit auch fremde Gene oder neue Sequenzen, welche die Genexpression beeinflussen können an gewünschten Stellen integriert werden. Mit diesem Ansatz ist es auch möglich, Genmutationen in erkrankten Tieren (oder Patient\*innen) z. B. in Organstammzellen zu reparieren (Genreparatur), um Gendefekte und die damit verbundenen krankhaften Auswirkungen in einem Organ zu beseitigen. Im Laufe der letzten Jahre wurde das CRISPR-Cas9 System weiter modifiziert, um z. B. die Expression bestimmter Gene zu beeinflussen. Entsprechend angepasste Versionen von Cas9 können mittels gRNAs an die regulatorischen Stellen von Genen dirigiert werden, um diese Gene zu aktivieren oder um sie abzuschalten.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des CRISPR-Cas9-Systems.**

Cas9 bindet mit Hilfe einer guide RNA (gRNA) an die ausgewählte Sequenz der DNA, die modifiziert werden soll, und bewirkt einen Doppelstrangbruch. Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) kann dann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: 1. dem fehleranfälligen nicht-homologen Reparaturweg, der zu einer Mutation im Leseraster der DNA führen kann und dadurch die Geninformation zerstört; 2. dem homologen Reparaturweg, der mit Hilfe von entsprechend modifizierten DNA Matrizen eine gewünschte Änderung in die Erbinformation einführen kann.

Um das CRISPR-Cas9 System in Tiere einzubauen, werden zumeist einzellige Embryos direkt mit einer ausgewählten gRNA, mit der mRNA für Cas9 und mit einer gewünschten DNA Matrize injiziert (**Abbildung 3**). Dieser Ansatz war erfolgreich in einer Reihe von Tierarten, wie Mäuse<sup>11</sup>, Ratten<sup>12</sup> und Affen<sup>13</sup>. Diese neuartigen Ansätze haben bisher nicht nur die Herstellung von Tiermodellen für Krebs ermöglicht, sondern auch für eine Vielzahl von neurologischen, immunologischen, kardiovaskulären und anderen Erkrankungen mit genetischer Grundlage. Erste Ansätze zur gentechnischen Reparatur von Erbkrankungen sind derzeit auch schon in ersten klinischen Anwendungen.

## Die Rekapitulation von humanem Krebs in Mausmodellen

In den letzten 40 Jahren wurden viele Mausmodelle der Krebsentstehung etabliert. Viele dieser Mauslinien rekapitulierten die bei menschlichem Krebs beobachtete mehrstufige Entwicklung sehr genau, z. B. für Brustkrebs, Insulinome, und Leukämien und Lymphome. Für andere Krebsarten ähnelten jedoch die Mausmodelle dem menschlichen Pendant nur ungenügend. Zum Beispiel erreicht die transgene Überexpression eines Onkogens ein Vielfaches der Expression des endogenen Genes, was zu einer Verzerrung der Prozesse führt, wie sie in Patient\*innen gefunden werden. Weiterhin tritt die transgene Expression von Onkogenen oder die Entfernung von Tumorsuppressorgenen in Knockout-Mäusen gewöhnlich in allen Zellen eines gegebenen Gewebes auf. Im Gegensatz dazu durchlaufen bei sporadischen Krebserkrankungen in Patient\*innen nur einzelne Zellen in einer Population nicht betroffener Zellen eine Transformation (klonales Auswachsen). Daher wurden grosse Anstrengungen unternommen, um Krebs von Patient\*innen möglichst exakt in Mäusen nachzubilden. Durch diese Rekapitulation der molekularen Prozesse, sind in den letzten Jahren in der Krebsforschung grosse Fortschritte erzielt worden.

Im Folgenden werden einige ausgewählte Beispiele für Studien in Mäusen beschrieben, die bestimmte Krebsarten sehr detailgetreu nachbilden können. Diese Modelle waren für die molekulare Analyse aller Phasen der Krebsentstehung, für die Entwicklung neuer Diagnosetechnologien und für die Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte von massgeblicher Bedeutung. Eine komplette Auflistung aller jemals hergestellten transgenen Mausmodelle und eine genaue Beschreibung der experimentellen Details würde jedoch den Rahmen dieses Beitrages sprengen.

## Lungenkrebs (Lungenadenokarzinom)

Einer der häufigsten Gendefekte, die in Lungenkrebs von Patient\*innen (und in Tieren) gefunden wird, ist eine Mutation im KRAS Gen, die eine Aktivierung des KRAS Proteins und dadurch eine erhöhte Zellteilung zur Folge hat. In einer Studie wurden Mäuse erzeugt, die gleiche Mutation des KRAS Gens in ihrem Genom tragen. Allerdings wurde ein eleganter molekularer Trick angewendet (**Abbildung 2**), bei dem das mutierte Gen normalerweise abgeschaltet ist, jedoch durch die Forscher\*in beliebig in Lungenzellen angeschaltet werden kann, wodurch in der Lunge ein Adenokarzinom entsteht<sup>14,15</sup>. Die genchirurgische Trickkiste erlaubte auch, das Gen in nur wenigen Zellen anzuschalten, sodass selektiv aus diesen Zellen klonale Tumore entstanden. Dieses Geschehen rekapituliert sehr genau die Entstehung von Lungenadenokarzinomen in Patient\*innen.

Mithilfe eines anderen genchirurgischen Tricks wurden Mäuse erzeugt, die ebenfalls eine aktivierte Version des KRAS Gens tragen, welches aber nur bei sporadischer Rekombination innerhalb der Chromosomen angeschaltet wird. Ähnlich wie Patient\*innen traten auch in diesen Mäuse Tumore in der Lunge nur sporadisch auf<sup>16</sup>. Die induzierbare Expression von aktiviertem KRAS in Lungenzellen wurde überdies mit Hilfe des Tetrazyklin-induzierbaren System erreicht (**Abbildung 1**). Eine solche gesteuerte Induktion der Onkogenexpression bewirkte innerhalb von zwei Monaten die Bildung von Adenomen und Adenomakarzinomen der Lunge<sup>17</sup>.

In den letzten Jahren wurden diese Mauslinien mit sporadischem Lungenkrebs mit anderen Mauslinien gekreuzt, welche weitere Mutationen trugen, die in Patient\*innen gefunden werden. Zum Beispiel führte die Einführung von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 zu einer Beschleunigung der Krebsentstehung und der Progression zu bösartigen Karzinomen. Des Weiteren konnten mit Hilfe dieser Modelle potenzielle Angriffspunkte für neue Therapien in sogenannten Proof-of-Con-

cept Experimenten überprüft werden. Im Prinzip wurden dazu Gene, die im Verdacht standen an der Krebsentwicklung eine ursächliche Rolle zu spielen, durch genetische Manipulation in den Mausmodellen inaktiviert und dann analysiert, ob die Krebsentwicklung gehemmt worden war. In vorklinischen Studien wurden und werden solche Modelle dann auch für die Testung neuentwickelter Therapien eingesetzt, die ihre Wirkung an diesen neuentdeckten Angriffspunkten ausüben<sup>18</sup>.

### Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreasadenokarzinom)

Auch im Bauchspeicheldrüsenkrebs spielt die Aktivierung des KRAS Proteins durch eine Genmutation eine sehr wichtige Rolle. Das Einschleusen einer aktiven Variante des KRAS Gens in Pankreas-Vorläuferzellen führt zur Entwicklung verschiedener Stadien von Pankreaskrebs. Von gutartigem bis hin zu fortschreitenden bösartigem (invasivem) und metastasierenden Krebs<sup>19</sup>. Die Häufigkeit von einem bösartigen duktalem Adenokarzinom mit multiplen Metastasen wurde vergrößert, wenn parallel zur krebsfördernden KRAS Mutation das INK4a/ARF Tumorsuppressorgen inaktiviert wurde<sup>20</sup>. Weitere genetische Veränderungen, wie beispielsweise die Deletion des Tumorsuppressorgen p53 erzeugte Tumore, die pathologisch nahezu identisch mit Pankreaskarzinomen in Menschen waren<sup>21</sup>. Entsprechend konnten diese Modelle auch für die Identifizierung und funktionelle Überprüfung der molekularen Prozesse genutzt werden, die an der Entstehung von Adenokarzinomen des Pankreas eine wichtige Rolle spielen. Dies hat letztendlich zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze geführt, die derzeit in klinischen Studien geprüft werden.

### Darmkrebs (Kolorektales Karzinom)

Tumore im Darm von Mäusen wurden schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts durch Behandlung mit krebsfördernden Substanzen verursacht. Inter-

essanterweise führte die Anwendung von N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff zur Mutation des Tumorsuppressorgen APC und zur Etablierung der ersten stabilen Mauslinie mit Adenomen im Dünndarm, die sogenannte APC<sup>min</sup> Mauslinie. Mutationen im APC Gen werden auch bei der vererbaren Form von Darmkrebs in Patient\*innen gefunden. Entsprechend führten die verschiedenen Versionen der Mutationen im APC Gen in einer Vielzahl von verschiedenen Knockout und Knockin Mauslinien zu unterschiedlichen Ausprägungen von gutartigen Adenomen und bösartigen Adenokarzinomen im Dün- oder Dickdarm. Auch im Darmkrebs sind viele weitere Mutationen in Onkogenen und in Tumorsuppressorgen entdeckt worden, z. B. aktivierende Mutationen im Gen für  $\beta$ -Catenin und im KRAS Onkogen oder inaktivierende Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen und in Genen des TGF $\beta$  Signalübertragungsweges. Kombinationen der Expression der mutierten Gene in verschiedenen Zelltypen des Darms oder kombiniert mit krebsfördernden Substanzen erlaubten es, die unterschiedlichen Untergruppen des Darmkrebses und ihre unterschiedlichen Entwicklungsstufen bis zur Metastasenbildung in der Leber zu rekonstruieren<sup>22</sup>. Es entstand eine Vielzahl an Mausmodellen, welche nun für die vorklinische Testung von spezifischen Therapieansätzen gegen die unterschiedlichen Untergruppen des Darmkrebses eingesetzt werden.

### Melanom

Eine der häufigsten Genveränderungen, die in Melanomen von Patient\*innen gefunden wird, ist eine aktivierende Mutation im BRAF Gen, das für ein Enzym kodiert, welches wichtige Signale für Zellwachstum übermittelt. Entsprechend wurde diese Mutation in Kombination mit anderen aktivierten Krebsgenen oder dem Verlust der Tumorsuppressorgene p53 oder INK4a in transgene Mauslinien integriert. Auch wurde Tetrazyklin-induzierbares aktiviertes HRAS, welches in der Signalkaskade oberhalb von BRAF wirkt, spezifisch in Melanozyten von INK4a-Knockout Mäusen exprimiert, was auch zur Entwicklung von Melanomen führte.



Melanome entwickeln sich aus Melanozyten, die beim Menschen in der Basalzellschicht der Epidermis verteilt sind. Bei Mäusen, die ein Fell haben, liegen die Melanozyten allerdings bevorzugt in Haarfollikeln. Trotzdem haben sich die Mausmodelle für Melanome als geeignet erwiesen, um zum Beispiel Hemmstoffe gegen BRAF und andere Signalübertragungskinasen zu testen. Auch wurde eine sehr erfolgreiche Krebs-Immuntherapie, die sogenannte Checkpoint Blockade zum ersten Mal in Mäusen mit Melanom entwickelt und getestet. Diese Art von Immuntherapie ist seit einigen Jahren zur Standardbehandlung von bösartigem Melanom geworden. Auch haben Experimente in Mausmodellen gezeigt, wie zum Beispiel eine hohe Exposition zu UV-Strahlen in der Kindheit die Entwicklung von Melanomen im Erwachsenenalter verursacht, eine wichtige Feststellung bezüglich der Nutzung von Sonnenschutz im Kindesalter. Hier hat sich zum Beispiel auch gezeigt, dass eine Mutation des BRAF Genes in der UV-induzierten Melanomen keine vorherrschende Rolle spielt und entsprechend solche Melanome mit anderen Therapien behandelt werden müssen<sup>23</sup>.

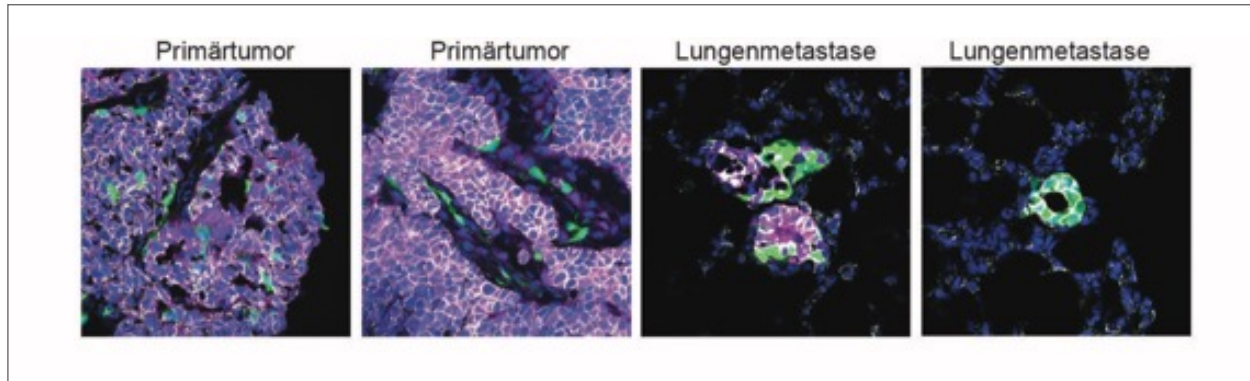
### Blutkrebs

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit von Blut ist es schon sehr früh gelungen, die genetischen Veränderungen von Leukämien, Lymphomen und anderen proliferativen Störungen von Blutzellen zu identifizieren. Die Integration von aktivierenden chromosomalen Translokationen der Gene für c-MYC, BCL2 und vielen anderen in den entsprechenden Vorläuferzellen transgener Mäuse hat die Entstehung von spezifischen Lymphomen hervorgerufen, wie sie in Patient\*innen gefunden werden. Mit den Fortschritten in der DNA Sequenzierung ist es nun auch schon bald klinische Routine alle Mutationen im Genom von Blutzellen aus Patient\*innen zu identifizieren, und neueste Ergebnisse zeigen, dass die Imitation der genetischen Veränderungen der individuellen Patient\*innen in der Maus das Krankheitsbild der Patient\*innen exakt kopiert. Solche personifizierte Ansätze werden

nun für jeden spezifischen Subtypen von Leukämien, Lymphomen oder proliferativen Blutzellerkrankungen zur Testung geeigneter Therapieansätze verwendet<sup>24-27</sup>.

### Neuartige Bildgebung entwickelt in Mausmodellen

Eine der brennenden Fragen der Krebsforschung ist, wie Krebszellen in einer späten Transformation bösartig (invasiv) werden, in das umliegende Gewebe eindringen und sich über Blut- oder Lymphgefäße in entfernte Organe verteilen, um dort Metastasen zu bilden. Etwa 90 % aller Todesfälle bei Krebspatient\*innen werden letztendlich durch Metastasen verursacht. Auch nimmt man heute an, dass diese Krebszellen auch für die Bildung von Resistenzen gegen Therapien verantwortlich sind. Daher ist es umso wichtiger diese spezifischen Krebszellen sichtbar zu machen, um sie isolieren und im Detail untersuchen zu können. Dies ist infolge Unkenntnis der Eigenschaften dieser Zellen in Patient\*innen derzeit nicht leicht möglich. Nichtsdestotrotz ist es kürzlich gelungen bösartige Brustkrebszellen in Mäusen zu markieren und diese sichtbar zu machen, indem ein Gen für ein fluoreszierendes Protein eingeschleust wurde. Dies ermöglichte die Isolierung der Krebszellen aus dem Tier und deren Analyse (**Abbildung 5**)<sup>28</sup>. Die Analyse der Genexpression dieser bösartigen Krebszellen ermöglicht nun die Identifizierung der treibenden Prozesse für Metastasenbildung und Therapieresistenz und damit die Entdeckung neuer Angriffspunkte für Therapien.



**Abbildung 5:**

*Gutartige und bösartige invasive Brustkrebszellen wurden mittels genetischer Markierung und Fluoreszenz-Mikroskopie in Primärtumoren und in Lungenmetastasen sichtbar gemacht. Rote Zellen = gutartige Krebszellen; grüne Zellen = bösartige Krebszellen; weiße Markierung = Krebszellen im Zellverband. Es zeigt sich, dass im Primärtumor in der Brustdrüse zu einem bestimmten Zeitpunkt nur wenige Krebszellen bösartig werden und aus dem Zellverband abwandern. Die bösartigen Krebszellen sind dann auch in Lungenmetastasen zu finden, wo sie zum Teil wieder einen Zellverband bilden<sup>28</sup>.*

Ein wichtiges klinisches Problem gibt es im speziellen Fall der Krebserkrankung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen in der Bauchspeicheldrüse, dem Insulinom. Die durch ein Insulinom verursachte Überproduktion von Insulin wird meist durch entsprechende Symptome und bei Routineuntersuchungen festgestellt, jedoch ist das meist sehr kleine Insulinom durch konventionelle Bildgebung in der relativ grossen Bauchspeicheldrüse nicht leicht zu finden. Oft muss während der Operation die gesamte Bauchspeicheldrüse abgesucht werden, was natürlich entsprechende Risiken trägt. Unter Nutzung eines transgenen Mausmodells, das menschliche Insulinome sehr präzise rekapituliert, wurde ein bildgebendes Verfahren entwickelt, das mit Hilfe von radioaktiv-markierten Liganden spezifisch nur Insulinomzellen bindet. Inzwischen klinische Routine, können damit nun mittels Szintigraphie vor der Operation alle Insulinome im Körper lokalisiert werden<sup>29</sup>.

## Schlussfolgerung

In Zusammenfassung muss man die wissenschaftlichen Stärken von Mausmodellen in der Krebsforschung durchaus kritisch gegenüber den gesellschaftlich-ethischen Überlegungen und den Vorgaben des Tierschutzes betrachten. Eine Gü-

terabwägung, wie sie im Schweizerischen Tierschutzgesetz strikt vorgeschrieben ist und in der ein biomedizinischer Erkenntnisgewinn das Leiden der Tiere überwiegen muss, findet daher in jedem Falle statt. Auf der einen Seite steht der Mangel an verfügbarer effizienter Therapie und der lebensbedrohliche Verlauf der meisten Krebserkrankungen und dem damit verbundenen Leid der Patient\*innen. Auf der anderen Seite stehen die Möglichkeiten den reproduzierbaren Krankheitsverlauf in Mausmodellen direkt zu überwachen und vor dem Eintreten physiologischer Veränderungen oder Einschränkungen im Verhalten der Tiere den Versuch abzubrechen. Letztlich stehen Tiermodelle in sogenannten Proof-of-Concept Studien am Ende einer langen Kette von Experimenten mit Krebszellen oder Gewebeprobe in Kulturschalen, um dann wieder in vorklinischen Studien am Beginn der klinischen Umsetzung der neu gewonnenen Erkenntnisse unentbehrlich zu sein.

---

## Referenzen

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
  2. Rangarajan, A. & Weinberg, R. A. Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* **3**, 952-959 (2003).
  3. Van Dyke, T. & Jacks, T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* **108**, 135-144 (2002).
  4. Jonkers, J. & Berns, A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 251-265 (2002).
  5. Lewandoski, M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743-755 (2001).
  6. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821 (2012).
  7. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2579-2586 (2012).
  8. Bibikova, M. et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* **21**, 289-297 (2001).
  9. Boettcher, M. & McManus, M. T. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell* **58**, 575-585 (2015).
  10. Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J. & Jasin, M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5172-5177 (1998).
  11. Shen, B. et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* **23**, 720-723 (2013).
  12. Shao, Y. et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc* **9**, 2493-2512 (2014).
  13. Niu, Y. et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* **156**, 836-843 (2014).
  14. Meuwissen, R., Linn, S. C., van der Valk, M., Mooi, W. J. & Berns, A. Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene. *Oncogene* **20**, 6551-6558 (2001).
  15. Jackson, E. L. et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* **15**, 3243-3248 (2001).
  16. Johnson, L. et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* **410**, 1111-1116 (2001).
  17. Fisher, G. H. et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* **15**, 3249-3262 (2001).
  18. Drosten, M. & Barbacid, M. Modeling K-Ras-driven lung adenocarcinoma in mice: preclinical validation of therapeutic targets. *J Mol Med (Berl)* **94**, 121-135 (2016).
  19. Hingorani, S. R. et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437-450 (2003).
  20. Aguirre, A. J. et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **17**, 3112-3126 (2003).
  21. Perez-Mancera, P. A., Guerra, C., Barbacid, M. & Tuveson, D. A. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* **142**, 1079-1092 (2012).
  22. Burtin, F., Mullins, C. S. & Linnebacher, M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J Gastroenterol* **26**, 1394-1426 (2020).
  23. Patton, E. E. et al. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* **39**, 610-631 (2021).
  24. Dunbar, A., Nazir, A. & Levine, R. Overview of Transgenic Mouse Models of Myeloproliferative Neoplasms (MPNs). *Curr Protoc Pharmacol* **77**, 14.40.11-14.40.19 (2017).
  25. Milne, T. A. Mouse models of MLL leukemia: recapitulating the human disease. *Blood* **129**, 2217-2223 (2017).
  26. Almosaileakh, M. & Schwaller, J. Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia. *Int J Mol Sci* **20** (2019).
  27. Pekarsky, Y., Zanesi, N., Aqeilan, R. I. & Croce, C. M. Animal models for chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Biochem* **100**, 1109-1118 (2007).
  28. Luond, F. et al. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy. *Dev Cell* **56**, 3203-3221 e3211 (2021).
  29. Wild, D. et al. Exendin-4-based radiopharmaceuticals for glucagonlike peptide-1 receptor PET/CT and SPECT/CT. *J Nucl Med* **51**, 1059-1067 (2010).
-

«Forschung für Leben» wurde 1990 gegründet. Der Verein informiert über die Ziele, Aufgaben und die Bedeutung der molekularbiologischen, medizinischen und pflanzenphysiologischen Forschung. Er ist bestrebt, auch ethische Fragen des mit diesen Bereichen verbundenen Fortschritts aufzugreifen und zu diskutieren.

## Werden Sie Mitglied bei «Forschung für Leben»

elektronisch auf:

**Einfach Klicken und Mitglied werden!**

[www.forschung-leben.ch/ueber-uns/mitgliedschaft/](http://www.forschung-leben.ch/ueber-uns/mitgliedschaft/)

oder per Schneckenpost an:

Verein «Forschung für Leben», 8000 Zürich  
T +41 78 933 04 76, buch@forschung-leben.ch

### IMPRESSUM

#### BioFokus

ISSN 2673-5040  
30. Jahrgang

#### Herausgeber

«Forschung für Leben»

#### Autoren

Prof. em. Dr. Gerhard Christofori

#### Redaktion

Prof. Dr. Felix Ehrensperger  
Dr. Iana Buch

#### Gestaltung

POMCANYS Marketing AG, [www.pomcanys.ch](http://www.pomcanys.ch)

#### Geschäftsstelle

Verein «Forschung für Leben»  
8000 Zürich  
[www.forschung-leben.ch](http://www.forschung-leben.ch)

#### Bankverbindung

ZKB Wiedikon, IBAN: CH27 0070 0111 5012 7795 2