

Eva-Maria Katharina Katzenmaier

Dr. sc. hum

Einfluss epigenetischer Modifikationen auf die Galektin-Expression und funktionelle Relevanz der Re-Expression von Galektin-12 auf die Karzinogenese des Kolonkarzinoms

Fach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kopitz

Galektine, eine konservierte Untergruppe der Lektine, sind durch das Vorhandensein einer CRD mit hoher Affinität für β -Galaktoside gekennzeichnet. Aufgrund ihrer Fähigkeit Glykoproteine und Glykolipide zu binden und eine Quervernetzung zu induzieren, modulieren sie zahlreiche für die Tumorgenese und das Tumorwachstum essenzielle Signalkaskaden. Darüber hinaus ist die neoplastische Transformation des CRC, die durch eine Dedifferenzierung von Tumorzellen gekennzeichnet ist, mit einem deutlich veränderten Expressionsmuster der Galektine assoziiert. Während die Expression von Gal-3 zunimmt, wurde eine deutliche Abnahme von Gal-4, -8, -9 und -12 festgestellt. Die transkriptionelle Regulation, die zu dieser veränderten Expression in Tumorzellen führt, ist noch weitgehend unbekannt. Differenzierungsabhängige Veränderungen der Genexpression können auf epigenetischen Modifikationen wie z.B. Histonacetylierung und DNS-Methylierung beruhen. Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit detailliert zu untersuchen, inwiefern die veränderte Expression von Galektinen in CRC-Zellen nach Induktion der Differenzierung durch NaBut auf eine epigenetische Regulation zurückzuführen ist. Hierfür wurden 4 MSI- und 5 MSS-CRC-Zelllinien mit dem DNS-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-dC bzw. dem HDAC-Inhibitor TSA inkubiert und anschließend umfassende Expressionsanalysen der Galektine -1-4, -7-9, -12 und -13 auf Transkript (PCR)- und Proteinebene (Western Blot) durchgeführt. Während der Einfluss von Histonacetylierungen in den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich war, konnte eine deutliche methylierungsabhängige Expression der Galektine -1 (5/9 Zelllinien), -2 (9/9 Zelllinien), -7 (7/9 Zelllinien), und -12 (5/9 Zelllinien) detektiert werden. Durch eine Bisulfitsequenzierung der Promotorregion wurde darüber hinaus zum ersten Mal eine direkte Assoziation zwischen der Hypermethylierung von DNS und der Inaktivierung des *LGALS12*-Gens nachgewiesen. Hinweise aus der Literatur deuten auf eine potente tumorsuppressive Eigenschaft von Gal-12 hin, das in 8 der 9 CRC-Zelllinien

inaktiviert war. Aufgrund dessen wurde es für weitere Analysen ausgewählt. Zusätzlich konnte eine deutliche Abnahme des Gal-12-Transkripts in 66 % der Primärtumore von MSI-CRC-Patienten, verglichen mit gesundem Kontrollgewebe, festgestellt werden.

Da die funktionelle Rolle von Gal-12 auf die Tumorgenese des CRC bis zum heutigen Tag völlig unklar ist, sollte in dieser Arbeit die MSI-CRC-Zelllinie HCT116 genetisch modifiziert werden, um ein Modellsystem zur funktionellen Charakterisierung zu etablieren. Stabile Klone, die eine einzelne Integration einer Dox-regulierbaren Gal-12-Expressionskassette aufwiesen, wurden durch das Verfahren des RMCE hergestellt. In zwei unabhängigen Klonen konnte die Dox-induzierbare Expression von Gal-12 auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden. Analysen zur subzellulären Lokalisation mittels Immunfluoreszenz ergaben eine Zellzyklus-abhängige Lokalisation. In der Interphase war Gal-12 hauptsächlich im Nukleus vorhanden, in der Mitose dagegen erfolgte ein Transport in das Zytoplasma. Zusätzlich konnte zum ersten Mal eine Kolo-kalisation von Gal-12 mit SC-35, einem Protein des Spleißosoms, das am alternativen Spleißen von prä-mRNS beteiligt ist, festgestellt werden. Funktionelle Analysen ergaben darüber hinaus eine potente hemmende Wirkung der Re-Expression von Gal-12 auf die invasive Eigenschaft von CRC-Zellen. Der in der Literatur beschriebene differenzierungsinduzierende Einfluss von Gal-12 war dagegen nicht feststellbar. Um die globale Auswirkung der Re-Expression des *LGALS12*-Gens auf die Tumorgenese des CRC zu analysieren wurde außerdem eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Da diese Ergebnisse nicht validierbar waren, sollten daraufhin zum ersten Mal potenzielle Bindepartner von Gal-12 identifiziert werden. Aufgrund der schwachen Bindeaffinität von Galektinen wurde das Verfahren des *in vitro* Crosslinkens gekoppelt mit Co-Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Analyse eingesetzt. Sieben potenzielle Bindepartner von Gal-12 konnten dadurch identifiziert werden. Hierzu zählen PHGDH, SLC3A2, SLC1A5, CD44, TUBB4A, CDK1 und VPS13C. Diese Proteine sind an zahlreichen für die Tumorgenese essenziellen Prozessen beteiligt und modulieren neben dem Metabolismus, den Zellzyklus sowie die invasive Eigenschaft von Tumorzellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression der Galektine im CRC epigenetisch reguliert wird. Darüber hinaus weist die Re-Expression von Gal-12 in der Dox-induzierbaren MSI-CRC-Zelllinie HCT116 eine potente tumorsuppressive Eigenschaft auf. Die in dieser Arbeit identifizierten Bindepartner von Gal-12 stellen somit die Grundlage dar, die funktionelle Rolle von Gal-12 auf die Karzinogenese des CRC in Zukunft detailliert charakterisieren zu können.