

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom - Biologe Patrick Höde
aus: Offenbach am Main
Tag der mündlichen Prüfung:

Epigenetische und funktionelle Analyse des Tumorsuppressorkandidaten 3 (TUSC3) im kolorektalen Karzinom

Gutachter: Prof. Dr. Michael Boutros
Prof. Dr. Jonathan Sleeman

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abstract	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Risikofaktoren.....	2
1.1.3. Charakterisierung und Entstehung.....	4
1.1.4. Stadien.....	7
1.1.5. Behandlungsmöglichkeiten	9
1.1.6. EGFR – „epidermal growth factor receptor“	12
1.1.7. Therapieresistenz durch Mutationen.....	14
1.2. Biomarker	16
1.2.1. Bedeutung von Biomarkern für Diagnose und Therapie.....	16
1.2.2. TUSC3 – „Tumor Suppressor Candidate 3“	16
1.3. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	22
2. Material & Methoden.....	24
2.1. Lösungen und Puffer	24
2.1.1. Analyse von DNA	24
2.1.2. Analyse von Proteinen.....	24
2.1.3. Subzelluläre Fraktionierung.....	26
2.1.4. Protein-Lysepuffer (Gewebe).....	26
2.2. Proben aus Patientengewebe	27
2.3. Proben aus Zelllinien	27
2.4. Transfektion.....	28
2.5. Gewinnung von DNA/RNA/Protein	29
2.6. MethyLight-Polymerasekettenreaktion	30
2.6.1. Bisulfitkonvertierung.....	30
2.6.2. MethyLight-Analyse.....	30
2.7. „Next Generation Sequencing“	31
2.8. „Western Blot“	33
2.9. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	36

2.10.	Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR).....	38
2.11.	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.12.	„Microarray“.....	41
2.13.	Subzelluläre Fraktionierung.....	43
2.14.	„Fluorescence activated cell sorter“ (FACS)/Durchflusszytometrie.....	44
2.15.	Luciferase-Reportergenanalyse.....	45
2.16.	Immunfluoreszenz (IF)-Methode.....	47
2.17.	MTT-Test.....	48
2.17.1.	Proliferations-Test.....	48
2.17.2.	Zytotoxizitäts-Test.....	48
2.18.	Immunhistochemie (IHC).....	49
2.19.	Statistische Analyse	50
3.	Ergebnisse.....	51
3.1.	Anstieg der Methylierung im Tumorgewebe bei Patienten mit kolorektalem Karzinom	51
3.2.	Validierung der Ergebnisse der MethyLight-Analyse mittels „Next Generation Sequencing“	53
3.3.	Verlust der TUSC3-Proteinexpression im kolorektalen Karzinomgewebe	54
3.4.	Analyse des Einflusses von TUSC3 auf Gene nachgeschalteter Signalwege	56
3.5.	Inhibition der EGFR-Phosphorylierung durch TUSC3	58
3.6.	Beeinflussung des EGFR-Aufkommens in einzelnen Zellkompartimenten durch TUSC3.....	60
3.7.	Keinen Effekt durch TUSC3 auf die Expression des EGFR an der Zelloberfläche	62
3.8.	Inhibierung der durch AKT und ERK1/2 vermittelten Signaltransduktion mittels TUSC3	63
3.9.	Inhibition der EGFR-Signaltransduktion durch TUSC3	65
3.10.	Inhibierung der durch Tunicamycin vermittelte Deglykosylierung des EGFR mittels TUSC3	67
3.11.	Lokalisation von TUSC3 am endoplasmatischen Retikulum.....	68
3.12.	Proliferations- und Überlebenshemmung von kolorektalen Karzinomzellen durch TUSC3	70
3.13.	TUSC3 vermittelte Apoptose in Kolonkarzinomzelllinien.....	72
3.14.	Korrelation der TUSC3-Proteinexpression und der Therapieantwort auf Cetuximab	74
4.	Diskussion.....	76
5.	Ausblick.....	92
	Danksagung	XVIII
	Literaturverzeichnis.....	XIX
	Anhang	XL

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt geschlechterübergreifend weltweit die dritthäufigste Tumorentität dar und ist für einen bedeutenden Anteil der Malignom-assoziierten Morbidität und Mortalität verantwortlich. Kolorektale Karzinome entstehen in den meisten Fällen sporadisch durch Mutation unterschiedlicher Gene. Die Behandlung eines Kolonkarzinoms ist von unterschiedlichen Gegebenheiten abhängig, hauptsächlich von der Art und dem Stadium des Tumors sowie von möglichen Begleiterkrankungen. Anhand dieser verschiedenen Parameter wird ermittelt, welche Behandlung die angemessenste für den Patienten ist. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Optionen einer Operation, einer Chemotherapie, einer Bestrahlung, einer Immuntherapie oder einer zielgerichteten Medikation. Zielgerichtete Therapien zielen auf tumorspezifische Merkmale der Karzinomzellen ab und versprechen eine Steigerung des Ansprechens der Therapie bei Reduzierung der Nebenwirkungen. Ein Ansatzpunkt ist dabei der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Aktivierende Mutationen von EGF-abhängigen Signalkaskaden stellen allerdings ein zentrales Problem in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms dar, da es durch diese Mutationen immer wieder zu einem Therapieversagen kommt. Tumormarker, die ein Therapieansprechen vorhersagen, sind daher im Rahmen der Therapieplanung von immenser Bedeutung. Diese Marker sind messbare Parameter biologischer Prozesse, die es ermöglichen, diagnostische oder prognostische Aussagen zu treffen. Tumormarker können einen Hinweis auf einen Tumor geben, da sie entweder ausschließlich bei einer Tumorerkrankung vorliegen oder im Vergleich zu einem gesunden Menschen in verstärktem Maße exprimiert werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Identifikation möglicher Mechanismen, die dabei helfen können, eben jene Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien zu durchbrechen. Das Tumorsuppressorgen *TUSC3* könnte ein solcher Marker sein. *TUSC3* ist eine Untereinheit des Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplexes an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Eine N-Glykosylierung von Wachstumsfaktoren (GFRs), wie dem EGF-Rezeptor, garantiert eine korrekte Insertion von Transmembranproteinen in die ER-Membran sowie den Transport vom ER zum Golgi und die stabile Einlagerung an der Plasmamembran. Da *TUSC3* an der N-Glykosylierung beteiligt ist und EGFR die N-Glykosylierung für seine normale Funktion benötigt, wurde die Hypothese formuliert, dass *TUSC3* entweder aufgrund einer Verringerung des Proteingehalts oder einer Reduktion der Aktivität von EGFR in KRK-Zellen den Zelltod fördert. Die epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie bildet das erste Glied einer komplexen Signalübertragungskaskade. Diese ist unter anderem für die Zellproliferation, das Überleben, die Adhäsion, die Migration und die Differenzierung essentiell. Die EGFR-Familie kann aber auch von der Plasmamembran in den Kern transportiert werden. Ein starker Anstieg an nukleärem EGFR (n-EGFR) wurde im Tumorgewebe entdeckt. Diese Erhöhung an n-EGFR korreliert mit einem schlechten klinischen Verlauf bei verschiedenen Tumorentitäten. Das Hauptziel dieser Arbeit war die bis dato unbekannte epigenetische und

funktionelle Analyse von TUSC3 im KRK. Ein spezifisches Ziel war die Analyse der epigenetischen Regulation durch den Methylierungsgrad des TUSC3-Promotors. Daher galt es zu Beginn der Arbeit, die Methylierung des TUSC3-Promotors zu validieren, indem der Methylierungsgrad der Gewebeproben der einzelnen Patienten bestimmt wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss des Methylierungsgrades auf die Expression des endogenen TUSC3-Proteins in den Gewebeproben untersucht. Außerdem galt es, den Einfluss von TUSC3 auf das „downstream signaling“, die Phosphorylierung und das Aufkommen des EGFR in den verschiedenen Zellkompartimenten zu untersuchen. Für die spezielle Untersuchung des EGFR im Nukleus wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Weiter sollte dabei auch der Einfluss auf die Signalweiterleitung zu einem späteren Zeitpunkt des Signalweges analysiert werden. Zusätzlich sollte die Möglichkeit einer Verbindung zwischen TUSC3 und der N-Glykosylierung mittels Tunicamycin untersucht werden. Ebenfalls erfolgte eine Überprüfung der Lokalisation von TUSC3 durch Immunfluoreszenzmarkierung mit Hilfe spezifischer Antikörper. Da zuvor gezeigt wurde, dass TUSC3 das EGFR-Signaling inhibiert, sollte im Anschluss der Blick auf spezifische Karzinommerkmale gerichtet werden. Zu diesen zählen unter anderem Änderungen der Proliferation und Apoptose. Beide werden dabei durch das EGFR-Signaling reguliert. Nicht zuletzt galt es die klinische Relevanz von TUSC3 zu prüfen. Insbesondere im Zusammenhang mit der Therapieresistenz gegenüber Cetuximab wurde der Frage nachgegangen, inwiefern TUSC3 möglicherweise als Tumormarker genutzt werden könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass TUSC3 im kolorektalen Karzinom am ER lokalisiert ist. So konnte ebenfalls bestätigt werden, dass TUSC3 im kolorektalen Karzinom, wie in anderen Tumorzelltypen, durch eine Hypermethylierung reguliert wird, indem die mRNA-Expression und damit auch die Proteinexpression von TUSC3 gesenkt wird. Als exemplarisches Zielprotein von TUSC3 konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals der EGFR identifiziert werden. Dieser Zusammenhang konnte bislang in keiner anderen Tumorentität nachgewiesen werden. Im Rahmen der Dissertation konnte gezeigt werden, dass TUSC3 die Aktivität von phosphoryliertem EGFR hemmt und die Akkumulation von nukleärem EGFR unterbindet. Außerdem wurde festgestellt, dass TUSC3 weiter stromabwärts des RAS/RAF/MEK/ERK- und des PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Weges auch die Expression von p-AKT und p-ERK1/2 verringert, die in der Karzinomzelle die Proliferation fördern und die Apoptose verhindern. Eine zusätzliche Validierung erfolgte anhand des „Microarrays“, der ebenfalls einen Einfluss von TUSC3 auf Gene der N-Glykosylierung und der Apoptose darlegte. Die Untersuchung der Reporterplasmide ergab, dass TUSC3 vielfältige Tumor-relevante Signalwege hemmt, allen voran den WNT-Weg. TUSC3 könnte somit als potenzieller neuer Biomarker zur Früherkennung und zur Prognose von menschlichem KRK beitragen und einen wichtigen Ausgangspunkt für die frühe Analyse der Chemoresistenz bei der systemischen Behandlung von KRK darstellen.

Abstract

Colorectal carcinoma is the third most common tumor in the world and as such is responsible for a substantial proportion of malignoma associated morbidity and mortality. Colorectal carcinomas arise in most cases sporadically by mutation of different genes. In addition, a number of risk factors have been identified that can cause such mutations. The treatment of a colorectal carcinoma depends on different conditions, mainly on the type and stage of the tumor, as well as on possible accompanying diseases. These different parameters determine which treatment is the most appropriate for the patient. There are different options such as the options for surgery, chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy or a targeted medication. Tumor-specific features of the carcinoma cells promise targeted therapies an increase in the response while reducing the side effects. A starting point is the epidermal growth factor receptor (EGFR). Activating mutations of EGF-dependent signal cascades represent a central problem in the therapy of metastatic colorectal carcinoma. Tumor markers that predict a therapy response are therefore of great importance in the context of therapeutic planning. Tumor markers can be indicative for a tumor because they are either exclusively present in a tumor disease or are expressed more intensively compared to a healthy person. Another critical point is the identification of possible mechanisms that can help to break the resistance against targeted therapies. The tumor suppressor gene (*TUSC3/N33*) may be a potential candidate for achieving this goal. *TUSC3* is a subunit of the oligosaccharyltransferase (OST) complex at the membrane of the endoplasmic reticulum (ER). N-glycosylation of GFRs like EGFR guarantees a correct insertion of transmembrane proteins into the ER-membrane, also the bulk ER-to-Golgi transport and stable emplacement at the plasma membrane. As *TUSC3* is involved in N-glycosylation and EGFR requires N-glycosylation for its normal function, the hypothesis has been formulated that *TUSC3* promotes cell death by either reducing the protein level or the activity of EGFR in CRC cells. The epidermal growth factor receptor family (EGFR) is the first link in a complex signaling cascade. This is essential, among other things, for cell proliferation, survival, adhesion, migration and differentiation. The EGFR family can also be transported from the plasma membrane into the nucleus. A strong increase in nuclear EGFR (n-EGFR) was detected in the tumor tissue. This increase in n-EGFR correlates with a poor clinical outcome for various tumor entities. However, the molecular function of *TUSC3* in CRC remained unknown. The main objective of this study was the epigenetic and functional analysis of *TUSC3* in colorectal cancer. Specific aims were the study of epigenetic regulation by analyzing the methylation level of the *TUSC3* promotor. It was therefore necessary to validate the methylation of the *TUSC3* promotor at the beginning of the study by determining the degree of methylation of the tissue samples of the individual patients. Furthermore, the influence of the methylation degree on the expression of the endogenous *TUSC3* protein in the tissue samples was investigated. In addition, the influence of *TUSC3* on "downstream signaling", the phosphorylation, and the advent of EGFR in the different cell

compartments was investigated. A subcellular fractionation was performed for the specific EGFR study in the nucleus. Furthermore, the influence on the signal propagation at a later point of the signaling pathway should be analyzed. In addition, the possibility of a link between TUSC3 and N-glycosylation by means of tunicamycin was investigated. The localization of TUSC3 was also monitored by immunofluorescence labeling with the help of specific antibodies. Because we previously demonstrated that TUSC3 inhibited EGFR signaling, we focused on the specific carcinoma characteristics. These include changes in proliferation and apoptosis. Both are regulated by EGFR signaling. Last but not least, the clinical relevance of TUSC3 was examined. In particular, in relation to the therapy resistance to cetuximab, the question arose as if TUSC3 could possibly be used as a tumor marker. In the present work, it was demonstrated that TUSC3 is located at the ER of the colorectal carcinoma. Thus, it was also confirmed that TUSC3 is regulated in colorectal carcinoma, by hypermethylation, by reducing the expression of mRNA and, thus, the protein expression of TUSC3. As an exemplary target protein of TUSC3, the EGFR was identified for the first time in this thesis. This correlation has not yet been demonstrated in any other tumor entity. The thesis has shown that TUSC3 inhibits the activity of phosphorylated EGFR and prevents the accumulation of nuclear EGFR. In addition, it was found that TUSC3 also reduces expression of p-AKT and p-ERK1/2, which promote proliferation in the carcinoma cell, downstream of the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway and prevent apoptosis. An additional validation was based on the microarray, which also showed an influence of TUSC3 on genes of N-glycosylation and apoptosis. TUSC3 showed no influence on the EGFR degradation and the presence on the plasma membrane as to the transferrin receptor control. Thus, TUSC3 seems to have an apoptotic function in ER which inhibits tumor growth and thus protects a protective function in colorectal carcinoma. The study of the reporter plasmids revealed that TUSC3 inhibits various tumor-relevant signaling pathways, above all the WNT pathway. TUSC3 could contribute to the early detection and prognosis of human KRK as a potential new biomarker and would be an important starting point for the early analysis of chemoresistance in the systemic treatment of KRK.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
β2M	Beta2-Mikroglobulin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
ACTB	Actin beta
AK	Antikörper
AKT	Alias Proteinkinase B (PKB)
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
APC	Adenomatöse polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AURKA	Aurora kinase A, auch serine/threonine-protein kinase 6
BAK1	BCL2 antagonist/killer 1
BCL2	B-cell lymphoma 2
BHQ1	Black hole quencher one
bidest.	Zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BRAF	B-Raf Protoonkogen, Serin/Threonin-Kinase
BRCA	Breast Cancer Gene; Brustkrebs-Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD71	Transferrinrezeptor-Antikörper
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation, angeborene Störungen der Glykosylierung
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid; Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHOP	C/EBP homologes Protein
CHX	Cycloheximid
CIN	Chromosomale Instabilität
Cp	Crossing point; Kreuzungspunkt

CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
cRNA	Complementary ribonucleic acid, komplementäre Ribonukleinsäure
CS	Cell signaling
Ct	Cycle threshold; Zyklus-Grenzwert
C-terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol; Fluoreszenz-Farbstoff
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DLD1	Zelllinie, menschliches Kolon-Adenokarzinom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiotreitol
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor; Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition; Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERBB	Erythroblastic leukemia viral oncogene
ERK	Extracellular signal regulated kinase; Extrazelluläre Signalregulierte Kinase
EV	Empty vector; Leervektor
FACS	Fluorescence activated cell sorter; Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal bovine serum; Fetales Rinderserum
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FGF1	Fibroblast growth factor-1; Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1
FITC	Fluorescein isothiocyanate; Fluoresceinisothiocyanat
FLAG(-tag)	FLAG octapeptide; Polypeptid-Proteintag
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreuung

g	Gramm
GFR	Growth factor receptor; Wachstumsfaktor-Rezeptor
GlcNAc-TIII	N-Acetylglukosaminyltransferase III
h	Hour(s); Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Hydrochloric acid; Salzsäure
HCT116	Zelllinie, humanes Kolonkarzinom
HEK283T	Human embryonic kidney cells; exprimieren das SV40 large T-Antigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Human epidermal growth factor receptor; humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1; Hypoxie-induzierter Faktor-1
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer; hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HRE	Hypoxia response element
HSP90	Heat shock protein 90, Hitzeschockprotein 90
HT29	Zelllinie, menschliches Kolon-Adenokarzinom
IF	Immunfluoreszenz
IGFR	Insuline-like growth factor receptor; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IHC	Immunhistochemie
IL-10	Interleukin-10
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>in vitro</i>	Im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	Im Lebendigen
kDa	Kilodalton, Einheit der atomaren Masse
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LOVO	Zelllinie, menschliches Kolon-Adenokarzinom
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase, auch ERKs

MEK	Mitogen activated protein kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
mg	Milligramm
MGAT	Mannosyl-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	Mismatch repair; Mismatch-Reparatur
mRNA	Messenger ribonucleic acid; Messenger-Ribonukleinsäure
MSH2	MutS Homolog 2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabil
mTOR	Mechanistic target of rapamycin; Ziel des Rapamycins im Säugetier
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
N	Normalgewebe
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
n-EGFR	Nuclear epidermal growth factor receptor; nukleärer epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ng	Nanogramm
NGS	Next- generation sequencing; Sequenzierung der nächsten Generation
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma; nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
N-terminal	Amino-terminal
OH	Hydroxy-Gruppe
Oligo(dt)-Primer	Oligo-deoxythymidin-Primer
OST	Oligosaccharyltransferase

p	Signifikanzwert
P1-P20	Patient 1 bis Patient 20
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PMR	Percentage of methylation ratio; prozentuales Methylierungsverhältnis
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPRE	PPAR response element
pT	p-Target; Leervektor-Kontrolle
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptosior-Tyrnkinase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction; Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Quantitative real time RT-PCR
RXR	Retinoid-X-Rezeptoren
s	Sekunde(n)
S+T	SPARC + TUSC3
SC	Santa Cruz (Firma)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-Gelelektrophorese
SFK	Src-family kinase

siRNA	Small interfering RNA; kleine eingreifende RNA
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine; Osteonectin
SRE	Serum response element
SSA	Sessile serratierte Adenome
SSC	Sidewards scatter; Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal transducers and activators of transcription; Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription
STT3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit
SV 40	Simian-Virus 40
SW480	Zelllinie, menschliches Kolon-Adenokarzinom
SYBR	SG-Cyanin-Farbstoff
T	Tumorgewebe
T3	TUSC3
TAE	Tris-Acetat EDTA
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TCF	T-cell-Faktor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor; transformierender Wachstumsfaktor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNM	Tumors/Nodes/Metastases, Tumorentitäten-Klassifizierungssystem
TP53	Tumor-Protein 53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Traditionell serratierte Adenome
TUN	Tunicamycin
TUSC3	Tumor suppressor candidate 3; Tumorsuppressorkandidat 3 (N33)
UICC	Union internationale Contre le Cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor, Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
WNT	Wingless-type MMTV integration site family

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassischer Weg der Tumorentstehung durch Mutationen	5
Abbildung 2: Die Stadien des kolorektalen Karzinoms	8
Abbildung 3: Aufbau des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR)	13
Abbildung 4: Zusammensetzung des humanen Oligosaccharyltransferase-Komplexes	19
Abbildung 5: Modell der Funktion des Tumorsuppressorkandidaten 3 (TUSC3).....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Nukleotid-Typen dNTP und ddNTP	32
Abbildung 7: Übersicht des Ablaufs der subzellulären Fraktionierung (Cox und Emilie, 2006).....	44
Abbildung 8: Die MethyLight-Analyse zeigt eine erhöhte Methylierungsrate im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zu Normalgewebe.....	51
Abbildung 9: Nachweis einer erhöhten Methylierungsrate mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS).....	53
Abbildung 10: Analyse der TUSC3-Expression in humanem kolorektalen Tumor- und Normalgewebe	55
Abbildung 11: Agarosegel der für die „Microarray“-Analyse verwendeten cDNA-Proben	56
Abbildung 12: Proteinprozessierung am endoplasmatischen Retikulum	57
Abbildung 13: Graphische Auswertung der qRT-PCR-Analyse der besten Kandidatengene des „Microarrays“	58
Abbildung 14: Einfluss von TUSC3 auf die Expression des EGFR im Gesamtzelllysat	59
Abbildung 15: Einfluss von TUSC3 auf die Expression des phosphorylierten EGFR im Gesamtzelllysat	60
Abbildung 16: Einfluss von TUSC3 auf die Expression von EGFR bzw. p-EGFR in subzellulären Fraktionen.....	61
Abbildung 17: FACS-Analyse zur Ermittlung des Einflusses von TUSC3 auf die N-terminale Domäne des EGFR	62
Abbildung 18: Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die nachgeschalteten AKT/ERK1/2-Signalwege	64
Abbildung 19: Luciferase-Test zur Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die EGFR-Signaltransduktion	66
Abbildung 20: Einfluss von TUSC3 und Tunicamycin auf die Glykosylierung des EGFR.....	68
Abbildung 21: Lokalisation von TUSC3 am endoplasmatischen Retikulum in einer kolorektalen HCT116 Zelle	69
Abbildung 22: Einfluss von TUSC3 auf Proliferation und Wachstum von KRC-Zellen unter Einfluss verschiedener Chemotherapeutika.....	70
Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von TUSC3 auf die Apoptose in Kolonkarzinomzellen	72
Abbildung 24: „Western Blot“-Analyse zur Untersuchung der TUSC3-vermittelten Apoptose in Kolonkarzinomzellen.....	73

Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung zur Analyse der TUSC3-Expression in humanem kolorektalen Tumorgewebe..... 75

Abbildung 26: Signalwege der ERBB-Familie..... 79

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: TNM-Klassifizierungssystem</i>	9
<i>Tabelle 2: TNM-Stadiengruppierung (nach UICC, 2002)</i>	9
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung des 50 × TAE-Puffers</i>	24
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung des 10 × Transfer-/Laufpuffers</i>	24
<i>Tabelle 5: Zusammensetzung des 1 × Laufpuffers</i>	25
<i>Tabelle 6: Zusammensetzung des 1 × Transferpuffers</i>	25
<i>Tabelle 7: Zusammensetzung des T-PBS-Puffers</i>	25
<i>Tabelle 8: Zusammensetzung des 5 × SDS-Ladepuffers</i>	26
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung des HL-Puffers</i>	26
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung des Protein-Lysepuffers</i>	27
<i>Tabelle 11: Bedingungen des PCR-Programms der MethyLight-PCR</i>	31
<i>Tabelle 12: Übersichtsliste aller verwendeten Antikörper</i>	35
<i>Tabelle 13: Zusammensetzung der Komponenten aus dem Verso cDNA-Kit für die cDNA-Synthese ...</i>	36
<i>Tabelle 14: PCR-Ansatz für PCRs mit dem GoTaq Green Master Mix</i>	37
<i>Tabelle 15: PCR-Ansatz für PCRs mit der GoTaq Flexi DNA-Polymerase</i>	37
<i>Tabelle 16: Bedingungen des PCR-Programms mit dem GoTaq Green Master Mix</i>	38
<i>Tabelle 17: Bedingungen des PCR-Programms mit der GoTaq Flexi DNA-Polymerase</i>	38
<i>Tabelle 18: Übersichtstabelle zur Graphik aus Abbildung 9a</i>	54
<i>Tabelle 19: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Analyse bezüglich der TUSC3-Expression in humanem kolorektalen Tumorgewebe</i>	74

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom stellt geschlechterübergreifend weltweit die dritthäufigste Tumorentität dar (Haggard und Boushey, 2009). Es besitzt die dritthöchste Morbiditätsrate bei Männern und die zweithöchste bei Frauen unter allen Karzinomen. Die weltweite jährliche Inzidenzrate für kolorektale Karzinome liegt bei ca. 1,4 Millionen und mit einer Mortalität von ca. 700.000 Fällen pro Jahr (im Jahr 2012) handelt es sich um die vierthäufigste malignomassoziierte Todesursache (WHO, 2014). In Deutschland lag die Inzidenz für kolorektale Karzinome im Jahr 2012 bei ca. 62.000 Patienten und die Mortalität bei 26.000 Patienten (Robert Koch-Institut, 2012). Bei 9,4 % der weltweit diagnostizierten Krebserkrankungen bei Männern und 10,1 % der weltweit diagnostizierten Krebserkrankungen bei Frauen handelt es sich um ein Kolonkarzinom (Haggard und Boushey, 2009).

Die geographische Verteilung der Krankheit ist sehr unterschiedlich. Sie zeigt in Ländern Nordamerikas, Europas und Ozeaniens ihre höchsten Inzidenzraten (Brenner, Kloor und Pox, 2014). Dabei besteht eine Assoziation mit dem westlichen Lebensstil (ballaststoffarme, kalorienreiche Ernährung, wenig Bewegung). Dieses wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Prävalenz des kolorektalen Karzinoms insbesondere in Ländern Afrikas, Zentral- und Südasiens niedriger ist, in Regionen also, in denen etablierte Risikofaktoren, wie westlicher Lebensstil, Alkohol- und Nikotinkonsum, von geringerer Bedeutung sind (Center, Jernal, Smith und Ward, 2009). In Schwellenländern mit einer stark wachsenden Wirtschaft, wie z. B. Singapur, Japan oder einige osteuropäische Länder, zeigt sich eine Verdopplung der Morbidität seit den 1970er Jahren. In Teilen von Osteuropa stieg die Mortalität von 1975 bis 1988 alle fünf Jahre um 5 % bis 15 % (Haggard und Boushey, 2009). Es lässt sich aber auch erkennen, dass die Inzidenzen in Nord- und Westeuropa mittlerweile stagnieren oder leicht rückläufig sind und die Zahl der Todesfälle seit den 1980er Jahren sinkt. Mögliche Gründe hierfür sind die ständig wachsende Zahl an Früherkennungsmöglichkeiten und die stetige Optimierung der Behandlung (Brenner et al., 2014).

Auch die Prognose für Patienten mit kolorektalem Karzinom hat sich in den letzten Jahren langsam, aber konstant verbessert. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate hat dabei in Ländern mit einem hohen Lebensstandard wie Deutschland und den damit verbundenen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten einen Wert von 65 % erreicht (Brenner et al., 2014). Die Überlebenswahrscheinlichkeit hängt dabei stark vom Stadium der Krankheit bei der Diagnosestellung ab. So sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 90 % im lokalen Anfangsstadium auf etwa 10 % für Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom (Siegel et al., 2012). Somit stellt die Früherkennung einen entscheidenden

prognostischen Faktor in der Therapie des kolorektalen Karzinoms dar. Ein anderer Faktor, der die Überlebensrate erhöht, ist der Zugang zu Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten, welcher in Industrienationen insgesamt besser ist (Hagggar und Boushey, 2009).

1.1.2. Risikofaktoren

Kolorektale Karzinome entstehen in den meisten Fällen sporadisch durch Mutation verschiedener Gene (Arnold, Goel, Blum und Boland, 2005). So wurde aber eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert, die das Auftreten eines kolorektalen Karzinomes begünstigen. Ein Risikofaktor ist das Alter. Das kolorektale Karzinom ist eine stark altersabhängige Tumorentität, deren Inzidenz mit steigendem Alter deutlich zunimmt. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt bei Männern und Frauen zum Zeitpunkt der Erkrankung ca. 70 Jahre; eine Erkrankung vor dem fünfzigsten Lebensjahr tritt nur bei etwa 10 % aller Patienten auf (Robert Koch-Institut, 2012).

Neben dem Lebensalter stellen umweltbedingte Faktoren, wie eine zu fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel und in der Folge Adipositas, die Hauptrisikofaktoren dar (Ma et al., 2013). Durch diese werden Entzündungsprozesse gefördert und der Hormonspiegel (z. B. Östrogen) verändert, was wiederum für die Entstehung eines Karzinoms relevante Faktoren sind (Coussens und Werb, 2002). Zu einer risikosteigernden Ernährung gehören dabei beispielsweise der übermäßige Konsum von rotem Fleisch (Rind, Schwein, Lamm) sowie von verarbeiteten Fleischprodukten (Wurst) (Santarelli, Pierre und Corpet, 2008). So stellen unter anderem Nitrosamine, die bei deren Verarbeitung und Zubereitung entstehen, krebserregende Substanzen dar, und der hohe Häm-Gehalt in rotem Fleisch ist ein proinflammatorischer und karzinogener Faktor. Wird Häm aus den Zellen freigesetzt, verursacht es oxidative Schädigungen und Entzündungen (Dutra und Bozza, 2014). Des Weiteren hat es die Eigenschaft, in Verbindung mit freiem Eisen freie Radikale zu bilden, welche die DNA der Zelle schädigen und das Zellwachstum von Tumoren verbessern (Ishikawa, Tamaki, Ohata, Arihara und Itoh, 2010, Kabat, Miller, Jain und Rohan, 2007). Übermäßiger Konsum von Alkohol und Tabak spielt, wie bei vielen anderen Tumorentitäten so auch beim kolorektalen Karzinom, eine maßgebende Rolle (Chan und Giovannucci; 2010, Liang, Chen und Giovannucci, 2009). Beim Alkohol sind es zum einen der hohe Kaloriengehalt, zum anderen Metabolite wie Acetaldehyde, die beim Abbau des Alkohols entstehen, denen eine Beteiligung in der Karzinogenese zugesprochen werden (Pöschl und Seitz, 2004). Das Rauchen von Zigaretten hat starken Einfluss auf die Entstehung und Wachstumsgeschwindigkeit adenomatöser Polypen (Botteri, Iodice, Bagnardi, Raimondi, Lowenfels und Maisonneuve, 2008). So entstehen beim Verbrennen von Tabak zahlreiche genotoxische Verbindungen, unter anderem heterozyklische Amine, Nitrosamine und polynukleare aromatische Kohlenwasserstoffe, die das Risiko

einer Erkrankung erhöhen (Giovannucci, 2001). Besonders eine Kombination aus Alkohol und Rauchen erhöht das Risiko, da es durch den Tabak zu DNA-Mutationen kommt, welche in Anwesenheit von Alkohol weniger effektiv zu reparieren sind (Pöschl und Seitz, 2004).

Neben den erwähnten umweltbedingten Faktoren, gibt es noch weitere Risikofaktoren, wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), zu denen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zählen (Jess, Rungoe und Peyrin-Biroulet, 2012). Bei Colitis ulcerosa liegt das Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, nach 10 Jahren Krankheitsdauer bei ca. 2 %, nach 30 Jahren aber schon bei 18 % (Eaden, Abrams und Mayberry, 2001). Bei Morbus Crohn geht man ebenfalls von einem erhöhten Risiko der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms aus, allerdings in geringerem Maße als bei Colitis ulcerosa (Ullman und Itzkowitz, 2011). Außerdem erhöhen sowohl eine eigene vorangegangene Karzinomerkrankung als auch eine positive Familienanamnese in Hinblick auf solide Tumoren das Risiko. So haben Verwandte ersten Grades eines Patienten mit kolorektalem Karzinom ein zwei- bis dreifach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Taylor, Burt, Williams, Haug und Cannon-Albright, 2010).

Ein weiterer wichtiger Faktor sind genetische Syndrome, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinome einhergehen. Diese hereditären Formen des kolorektalen Karzinoms sind auf angeborene Genmutationen zurückzuführen. Dabei ist der Zeitpunkt der Diagnose ein möglicher Hinweis auf eine familiäre genetische Veränderung, denn diese wird meist früher gestellt als bei einem Patienten mit einem nicht-hereditären Kolonkarzinom. Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) bilden die Patienten bereits in einem frühen Lebensalter eine Vielzahl von Polypen im Dickdarm aus und haben damit eine hohe Wahrscheinlichkeit, schon in jungem Alter ein KRK zu entwickeln. Der Grund dafür ist eine Mutation im Tumorsuppressorgen *APC* (Centelles, 2012). Beim hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch Syndrom), der häufigsten erblichen Form des kolorektalen Karzinoms, kommt es zu Mutationen in den Genen *MLH1* und *MSH2* (Lynch und Smyrk, 1996). Diese sind an der DNA-Reparatur beteiligt und werden supprimiert. Patienten, die diese Mutationen aufweisen, haben ein 70%iges bis 80%iges Lebenszeitrisiko für die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom (Stoffel, 2010). Im Vergleich zur FAP kommt es hierbei kaum zu einer Polypenbildung. Veränderungen in den oben genannten Risikogenen erhöhen auch das Risiko für die Erkrankung an anderen Tumorentitäten. Auslösend für diese Erkrankungen sind Defekte in Proteinen, die für die Reparatur der DNA maßgeblich sind (MSI) (Aarnio, Mecklin, Aaltonen, Nyström-Lathi und Järvinen, 1995; Papadopoulos et al., 1994). Sowohl die FAP als auch das Lynch-Syndrom werden autosomal dominant vererbt (Bertario et al., 1999); das Vererbungsrisiko der Folgegeneration eines Anlagenträgers liegt daher bei 50 %.

Eine gezielte Senkung der Inzidenz eines kolorektalen Karzinoms ist grundsätzlich jedoch sehr schwierig. Es wurden verschiedene Risikofaktoren identifiziert, die sich zudem wechselseitig

beeinflussen können (Pöschl und Seitz, 2004). Darüber hinaus werden die meisten malignen Tumore durch sporadische Mutationen verursacht. Das Erkennen eines entstehenden kolorektalen Karzinoms und dessen Therapie sind folglich von entscheidender Bedeutung.

1.1.3. Charakterisierung und Entstehung

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms kann auf verschiedenen Mechanismen basieren. Diese werden im Nachfolgenden erläutert. Vogelstein et al. zeigten bereits 1988, dass es sich aus histologischer Sicht bei kolorektalen Karzinomen überwiegend um Adenokarzinome handelt. Sie gehen meist in einem mehrstufigen Prozess aus adenomatösen Polypen hervor. Dieser Vorgang wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und ist der am häufigsten für die Entstehung des KRK verantwortliche Vorgang (Vogelstein et al., 1988).

Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist durch chromosomale Instabilität (CIN) charakterisiert und wird durch Mutationen des *APC* (adenomatöses Polyposis coli)-Gens ausgelöst (Worthley und Leggett, 2010). Durch die Mutationen von *APC* wird das adenomatöse Polyposis coli-Protein inaktiviert, was zu einer verringerten Inaktivierung von β -Catenin führt und folglich in einer Überaktivität des WNT-Signalweges resultiert (MacDonald, Tamai und He, 2009). In 90 % aller kolorektalen Karzinome wurde eine Änderung des Aktivitätsniveaus des WNT-Signalweges gefunden (Thorstensen et al., 2005). Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Expression pro-proliferativer Faktoren wie c-Myc und Cyclin D1 und zu einer Förderung von Zellwachstum und Migration (Logan und Nusse, 2004). Aufgrund sukzessiver Mutationen kommt es zu einer malignen Transformation des Epithels und damit zu einem frühen Adenom. Im Verlauf der von Vogelstein et al. (1988) beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es in der transformierten Zelle zu weiteren Mutationen, was dazu führt, dass sie sich zu einem Malignom entwickelt. Dazu zählt unter anderem die Mutation des *TP53*-Gens (Vogelstein et al., 1988). Weitere zentrale Mutationen betreffen das *RAS*-Gen und führen zu einer Aktivierung des EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)-Signalweges (Peinado, Fernandezrenart, Capella, Wilson und Perucho, 1993; van Eijk et al., 2011) (Abbildung 1).

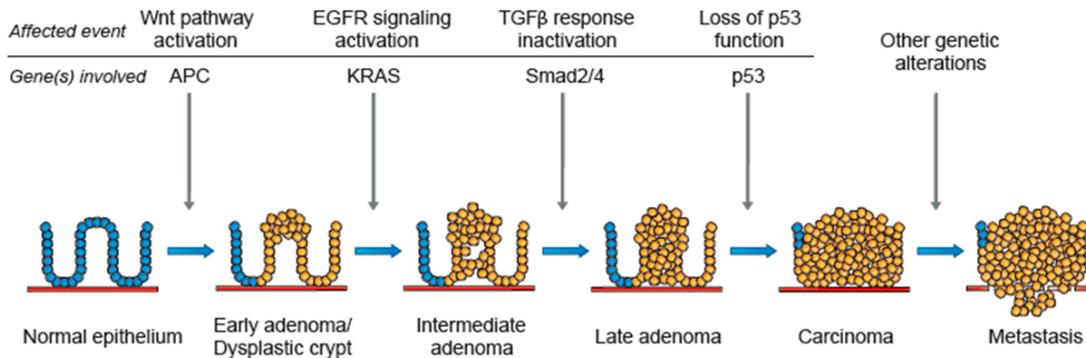


Abbildung 1: Klassischer Weg der Tumorentstehung durch Mutationen

Schematische Darstellung des klassischen Weges der Tumorentstehung und Mutationen verschiedener Tumorsuppressorgene (¹ Davies R. J., et al., 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis, Nature Review Cancer 5:199-209).

CIMP-Mechanismus („CpG Island Methylator Phenotype“)

Ebenfalls häufig verantwortlich für die Karzinogenese eines kolorektalen Karzinoms ist der CIMP („CpG Island Methylator Phenotype“)-Mechanismus (Tariq und Ghias, 2016). Dieser sorgt für eine epigenetische Instabilität, welche die Grundlage für hereditäre Erkrankungen an einem Karzinom darstellt. Diese epigenetische Veränderung erfolgt während der neoplastischen Transformation in Kolon-Epithelzellen (Kim, Lee und Sidransky, 2010/1). In der Folge wird die Entstehung von Karzinomen durch die Methylierung von Gen-Promotoren begünstigt, ohne dass die Gene an sich geschädigt werden (Wajed, Laird und DeMeester, 2001). Durch die Hypermethylierung von Promotorregionen kommt es zu einer verminderten Transkription des betroffenen Abschnitts; dies wiederum führt zu einer epigenetischen Inaktivierung der Expression bedeutender Tumorsuppressorgene (Ogino und Goel, 2008; Worthley und Leggett, 2010). Die Ursache hierfür ist, dass sich das betroffene Gen durch eine verstärkte Histonbindung nicht entfalten kann und damit die Ablese rate vermindert wird. Das kolorektale Karzinom betreffend, lässt sich eine erhöhte Methylierungsrate nicht nur in den Karzinomzellen selbst, sondern auch im umliegenden benignen Gewebe nachweisen. Auch in einem fortgeschrittenen Stadium der Kolonkarzinogenese spielt die Hypermethylierung spezifischer Gene eine wichtige Rolle, da auf diese Weise bestimmte onkogene Prozesse verändert werden (Tariq und Ghias, 2016). Eine DNA-Methylierung mehrerer Promotoren kann auch als Biomarker zur Früherkennung sowie zur Überwachung von Patienten mit kolorektalem Karzinom dienen (Yi et al., 2012). Des Weiteren können die Methylierungsmuster zur Prognose metastatischer oder aggressiver kolorektaler Karzinome genutzt werden (Kim et al., 2010/1).

¹ <http://syscol-project.eu/about-syscol/>

Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Ein weiterer Mechanismus KRK-assoziierter Karzinome ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Bei Mikrosatelliten handelt es sich um repetitive DNA-Sequenzen, die über das Genom verteilt sind (Kim und Park, 2015). Liegt eine MSI vor, kommt es zu einer Veränderung der Nukleotidanzahl und damit zu einer Längenveränderung der DNA-Sequenzen der Tumor-DNA. Dies geschieht als Folge von Inaktivierung, Mutationen oder der epigenetischen Abschaltung von „Mismatch“-Reparatur-Genen (MMR) (Boland und Goel, 2010). Die Hauptfunktion der postreplikativen MMR ist es, Basen-Basen-Fehlpaarungen zu eliminieren. Diese entstehen als Konsequenz einer versetzten Position der DNA-Polymerase während der DNA-Synthese (Pawlik, Raut und Rodriguez-Bigas, 2004). Ein Defekt der Gene, die für die Reparaturproteine kodieren, führt zu einem Ausfall des Systems und als Folge zu einer Anhäufung von Mutationen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um den Verlust des *MLH1*-Gens. Die Mutation dieser Reparaturgene hängt auch mit der Entstehung des Lynch-Syndroms zusammen.

Mikrosatelliteninstabilität lässt sich unterteilen in MSI-H („high-frequency“) und MSI-L („low-frequency“) (Boland und Goel, 2010). Als dritten Typ gibt es stabile Mikrosatelliten (MSS); so gibt es bei ca. 40 % der Patienten mit Lynch-Syndrom-Tumoren keine Mutationen in DNA-Reparaturgenen (Holinski-Feder und Grabowski, 2006). Nach Einschätzung von Holinski-Feder und Grabowski (2006) wird davon ausgegangen, dass die Tumore aufgrund der fehlenden MSI keine verkürzte Adenom-Karzinom-Sequenz durchlaufen. Ferner vermuten sie, dass die Tumore keine erhöhte Immunogenität haben (Holinski-Feder und Grabowski, 2006). Patienten mit kolorektalem Karzinom, die an MSI-H-Tumoren leiden, weisen eine günstigere Prognose auf als Patienten ohne MSI (Jasperson, Tuohy, Neklason und Burt, 2010).

„Consensus molecular subtypes“ (CMS)

Bei der Einordnung der Karzinome in einen der drei genannten Mechanismen (Adenom-Karzinom-Sequenz, CIMP, MSI) kommt es des Öfteren zu Diskrepanzen, die ihre Ursache in Unterschieden der Datenverarbeitung und Algorithmen haben. Daher haben Guinney et al. (2015) sechs unabhängige Klassifizierungssysteme vernetzt und sie zu vier molekularen Subtypen mit unterschiedlichen Merkmalen vereint. Diese nennen sich „consensus molecular subtypes“ (CMS). Der Subtyp CMS1 (MSI immun) macht etwa 14 % der kolorektalen Karzinome aus. Diese sind mikrosatelliteninstabil, hypermutiert und haben eine starke Immunaktivität. CMS2 (kanonisch) schließt die größte Menge an kolorektalen Karzinomen ein (37 %); sie sind chromosomal instabil, epithelial und an der WNT- und MYC-Signalaktivierung beteiligt. Etwa 13 % der kolorektalen Karzinome entfallen auf CMS3 (metabolisch). Diese Gruppe wird durch eine offensichtliche metabolische Dysregulation beschrieben.

CMS4 (mesenchymal) umfasst 24 % der Fälle und ist durch eine bekannte Aktivierung des Wachstumsfaktors β , eine Invasion des Stromas und eine erhöhte Angiogenese charakterisiert. Die verbleibenden, nicht CMS1- bis CMS4- zuzuordnenden 13 % sind vermutlich auf intratumorale Heterogenität oder einen Übergangsphänotyp zurückzuführen (Guinney et al., 2015). Bei dieser Einteilung in Subtypen handelt es sich aktuell um das beste und stabilste Klassifizierungssystem kolorektaler Karzinome.

Außerdem gibt es Vorläufer-Adenome, die über einen serratierten Karzinogeneseweg entstehen. Dabei unterscheidet man zwischen sessilen serratierten Adenomen (SSA) und traditionell serratierten Adenomen (TSA) (Tannapfel, Neid, Aust und Baretton, 2010). Sessile serratierte Adenome sind im rechtsseitigen Kolon lokalisiert. Ihre Größe liegt für gewöhnlich bei über 5 mm. Sie ragen nicht polypös in das Darmlumen. Bei traditionellen serratierten Adenomen handelt es sich dagegen um polypoid in das Darmlumen ragende Läsionen. Sie kommen hauptsächlich im linksseitigen Kolon sowie im Rektum vor und machen ca. 1 % aller kolorektalen Adenome aus. Ein Merkmal der TSA ist ihre hohe Anzahl von *KRAS*-Mutationen (Tannapfel et al., 2010).

Das kolorektale Karzinom entwickelt sich nur sehr langsam über einen Zeitraum von mehreren Jahren oder sogar Jahrzehnten. Dabei kommt es vermehrt zu Mutationen im genetischen Material, die spontan, durch den Einfluss verschiedener Substanzen oder hereditär bedingt auftreten können (Brenner et al., 2014). Kanzerogene haben eine genotoxische Wirkung auf die DNA und führen zu Mutationen von Genen der Regulation des Zellzyklus und in der Folge zu einer Entartung der Zelle. Solange das eigene Immunsystem oder zelleigene Reparaturmechanismen diese Mutationen erkennen und durch Vernichtung der entarteten Zellen beheben oder genetische Veränderungen durch eine Reparatur korrigieren, entstehen keine soliden Tumore. Allerdings haben einige Tumorzellen einen „Escape“-Mechanismus erworben, somit exprimieren sie im Falle einer Immunevasion keine tumorspezifischen Antigene und werden von dem Immunsystem nicht als entartete Zellen erkannt. Als Folge häufen sich die Mutationen in den einzelnen Zellen, was schlussendlich zu einem Karzinom führt (Loeb, Loeb und Anderson, 2003).

1.1.4. Stadien

Die frühe Form des kolorektalen Karzinoms breitet sich zunächst in der Darmwand aus und ist auf die submukösen Schichten beschränkt (Karzinom *in situ*) (Kudo, 1993). Von dort kann es durch die Submucosa, die Tunica muscularis und die Subserosa in die nahegelegenen Lymphknoten oder in Blutgefäße gelangen und sich somit im Körper ausbreiten – es kommt zu Metastasierung und wandüberschreitendem Wachstum (Abbildung 2).

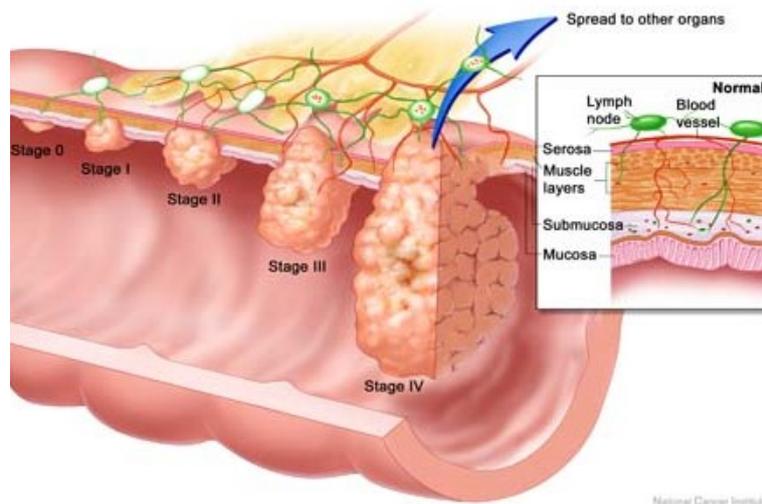


Abbildung 2: Die Stadien des kolorektalen Karzinoms

Graphische Darstellung der verschiedenen Stadien des kolorektalen Karzinoms und ihrer Lage in der Darmwand (² Terese Winslow, National Cancer Institute, 2005).

Bei der Diagnose wird der Ausbreitungsgrad des soliden Tumors anhand verschiedener Stadien beschrieben. Das Stadium der Erkrankung spielt eine entscheidende Rolle bei der Wahl der Therapie, aber auch bei der Abgabe einer Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs.

Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, die Stadien bei soliden Tumoren einzuordnen. Das am häufigsten beim kolorektalen Karzinom, aber auch bei vielen anderen Tumorentitäten verwendete System ist das TNM (tumor/nodes/metastases)-System (Puppa, Sonzogni, Colombari und Pelosi, 2010; Quirke et al., 2010). Es wurde bereits in den Jahren 1943–1952 von Pierre Denoix entwickelt und erstmals 1946 publiziert (Denoix, 1946). Seit 1950 wird dieses System von der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC, 2002) genutzt und weitergeführt. Es beschreibt die Tiefe der Infiltration des Karzinoms in die Darmwand und seine Ausbreitung in benachbarte Strukturen, das Ausmaß des Lymphknotenbefalls und das Vorhandensein von Fernmetastasen. Der Buchstabe T steht hierbei für die Ausbreitung des Primärtumors, beginnend mit dem Stadium T0 ohne Anhaltspunkt für einen Primärtumor, aufsteigend bis Stadium T4, bei welchem der Tumor das viszerale Peritoneum perforiert bzw. direkt andere Organe infiltriert hat. N beschreibt den Lymphknotenbefall, wobei N0 bezeichnet, dass keinerlei Metastasen gefunden wurden, bei N1 dagegen 1-3 und bei N2 ≥ 4 lokale Lymphknotenmetastasen nachweisbar waren. Liegt ein Lymphknotenbefall entlang der Mesenterialgefäße vor, so wird dieser mit N3 beschrieben. Fernmetastasen erhalten die Bezeichnung M1 (Tabelle 1).

² Abgerufen am 29.09.16 von <http://www.teresewinslow.com/portshow.asp?nxt=13&sid=597ACE8F-6CF2-4DBC-A240-B0AE161AB70C&portfolioid={4B56C61F-9C24-47C6-9F4D-9444E1D75BA2}>

Tabelle 1: TNM-Klassifizierungssystem

(T = Tumor; N = Nodes; M = Metastases; Prinz (2012))

Tis	Inter epithelial oder Lamina propria
T1	Infiltration der Submucosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa oder in perikolisches/-rektales Gewebe
T4	Infiltration von Nachbarorganen oder des Bauchfells (Peritoneum viscerale)
N0	Keine Metastasen in den Lymphknoten
N1	Metastasen in ein bis drei perikolischen (perirektalen) Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als drei perikolischen (perirektalen) Lymphknoten
N3	Metastasen entlang eines benannten Gefäßstammes und/oder apikale Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (meist Leber und Lymphknoten gefolgt von Peritoneum, Lunge, seltener Skelett, Nebennieren oder Gehirn)

Die UICC hat eine zusätzliche Klassifikation eingeführt, in der unterschiedliche TNM-Klassen kombiniert und in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Damit werden alle entscheidenden Merkmale der Tumorklassifikation berücksichtigt und erhalten eine Gewichtung (Tabelle 2; UICC, 2002). Das Stadium der Tumorerkrankung korreliert mit den Überlebenschancen, daher werden die Stadien für die Prognose und die daraus resultierende weitere Therapieplanung genutzt (O'Connell, Maggard und Ko, 2004). Liegt die 5-Jahre-Überlebenschance im Stadium I noch bei ca. 87%, so fällt diese in Stadium IIA auf 80%, in Stadium IIB sogar auf 49% ab. Für Stadium III liegt die Überlebensrate bei 84% (A), 71% (B) und 58% (C). Im Stadium IV liegt die Überlebensrate nur noch bei ca. 12% (Howlader et al., 2017).

Tabelle 2: TNM-Stadiengruppierung (nach UICC, 2002)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.5. Behandlungsmöglichkeiten

Nach Diagnose und Staging wird die Entscheidung über das weitere therapeutische Vorgehen in einer interdisziplinären Konferenz aus Chirurgen, internistischen Onkologen und Strahlentherapeuten festgelegt. Die einzige kurative Therapie stellt dabei die chirurgische Resektion bei lokal begrenzter Erkrankung dar (Brenner et al., 2014).

Die Behandlung eines Kolonkarzinoms ist von unterschiedlichen Gegebenheiten abhängig, von der Art und dem Stadium des Tumors sowie von möglichen Begleiterkrankungen. Auch der allgemeine Zustand des Patienten, d.h. dessen physische und psychische Verfassung, aber auch dessen Meinung spielt eine

nicht unwesentliche Rolle. Eine Behandlung auftretender Nebenwirkungen und Symptome sollte in jedem Fall zusätzlich erfolgen.

Anhand dieser verschiedenen Parameter wird ermittelt, welche Behandlung die adäquateste ist. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Optionen einer Operation, einer Chemotherapie, einer Bestrahlung, einer Immuntherapie oder einer zielgerichteten Medikation. Üblich ist, dass mehrere Methoden kombiniert werden. So erfolgt bei einer adjuvanten Therapie eine Therapie (Chemo- und/oder Strahlentherapie) nach der Operation, im Vergleich dazu erfolgt die Chemo- oder Strahlentherapie bei der neoadjuvanten Therapie vor einer Operation.

Die Behandlung ist abhängig von der Progression des Tumors. In Stadium 0 reicht für gewöhnlich eine Entfernung des *in situ*-Karzinoms mittels Mukosa-Resektion aus. Dies geschieht meist endoskopisch und nur noch selten operativ. In Stadium I werden lediglich der Tumor und die Lymphknoten operativ entfernt. Bei einem Kolonkarzinom in Stadium II wird neben der Operation in einigen Fällen eine neoadjuvante Therapie angewandt, um den Umfang der Operation zu verringern. Bei einem rektalen Karzinom in Stadium II wird vor oder nach der Operation gewöhnlich eine Strahlen- und Chemotherapie durchgeführt. Bei Stadium III folgt auf die Operation eine adjuvante Chemotherapie. Diese kann bei einem rektalen Karzinom zusätzlich mit einer Strahlentherapie kombiniert werden. Kommt es zu einer Fernmetastasierung, so werden alle Therapiemöglichkeiten, abgesehen von der Operation, angewandt, um im Sinne der palliativen Therapie das Überleben zu verlängern. Die 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Stadium liegt bei ca. 10 % (Platell, 2011; Howlader et al., 2016). Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Behandlungsmöglichkeiten genauer betrachtet.

Operation

Frühe Vorstufen des Karzinoms, meist Darmpolypen, lassen sich oft endoskopisch entfernen. Ist dies nicht mehr möglich, erfolgt die häufigste Behandlung eines kolorektalen Karzinoms, die Operation. Bei der operativen Resektion wird der Tumor mit umliegendem gesunden Gewebe exziiert. Neben Teilen des gesunden Kolons oder Rektums werden auch im umliegenden Bereich befindliche Lymphknoten entfernt. Die am häufigsten durchgeführte Form der Operation ist die laparoskopische, minimal-invasive operative Entfernung des Tumors (Bonjer, Deijen und Haglind, 2015). Dabei gibt es zwei Operationsverfahren, die Transanale Endoskopische Mikrochirurgie (TEM) oder die Totale Mesorektale Exzision (TME), welche nur für Rektumkarzinome genutzt wird (Althumairi und Gearhart, 2015). Kolonkarzinome werden abhängig von der Tumorgröße meist offen mittels Hemikolektomie operiert (Cunningham et al., 2010). In manchen Fällen ist es notwendig, eine künstliche Ausleitung des

Dickdarms (Kolostomie) anzulegen (Heald und Ryall, 1986; Ruiz-Tovar, Jiménez-Miramón, Valle und Limones, 2010).

Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie werden hochenergetische Röntgenstrahlen verwendet, um die Tumorzellen zu zerstören. Diese Art der Behandlung wird oft bei einem rektalen Karzinom eingesetzt (Gollins, 2010). Sollte sich der Tumor in Leber oder Lunge ausgebreitet haben, gibt es die Möglichkeit einer stereotaktischen Bestrahlung. Dabei wird diese Gegend sehr präzise mit einer hohen Strahlendosis behandelt (van Gijn et al., 2011).

Je nach Beschaffenheit und Stadium des Tumors kann vor der Operation eine neoadjuvante Therapie durchgeführt werden. Es handelt sich dabei um eine Strahlentherapie oder eine Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie. Die Kombination wird ausschließlich beim Rektumkarzinom angewandt. Dies ermöglicht es, die Größe des Tumors zu reduzieren, eine Operabilität zu ermöglichen und so die Rezidivrate zu senken (Minsky, 2010). Bei einem hohen Rückfallrisiko erhalten Patienten eine adjuvante Therapie, die nach einer Operation erfolgt. Bei Patienten mit einem Karzinom im Enddarm handelt es sich dabei um eine Chemotherapie oder sogar eine Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie, bei Patienten mit einem soliden Tumor im Dickdarm um eine nachfolgende Chemotherapie (van Gijn et al., 2011).

Chemotherapie

Die Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms geht unter den Therapie-Optionen mit den stärksten Nebenwirkungen einher. Sollten diese den Patienten zu sehr beeinträchtigen, muss die Dosierung verringert werden (Aschele, Bergamo und Lonardi, 2009). Bei der Chemotherapie werden dem Patienten Medikamente verabreicht, die dazu führen, dass die Karzinomzellen nicht mehr wachsen oder Apoptose induziert wird (Aschele et al., 2009). Dabei ist die Gabe von einem, meist aber einer Kombination von Medikamenten parallel über einen bestimmten Zeitraum möglich. Zu den verwendeten Chemotherapeutika zählen z. B. Oxaliplatin, das dafür sorgt, dass entstehende Stoffwechselprodukte mit der DNA interagieren und so Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen bilden, und 5-Fluoracil, das zu den Antimetaboliten zählt, Ähnlichkeit mit der Pyrimidinbase Uracil hat und außerdem die Thymidilat-Synthase hemmt, was zu einer Hemmung des Zellwachstums führt (Longley, Harkin und Johnston, 2003). Ein weiteres Arzneimittel, welches häufig in der Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms Verwendung findet, ist Irinotecan, ein Topoisomerase-I-

Inhibitor. Durch seine Bindung an die Topoisomerase-I und deren konsekutiver Hemmung kommt es zu Strangbrüchen der DNA und daraus resultierender Einleitung der Apoptose bzw. Proliferationshemmung (Mathijssen, Loos, Verweij und Sparreboom, 2002). Diese drei Arzneimittel werden in den aktuell gängigsten und effizientesten Chemotherapie-Protokollen verwendet. Bei dem FOLFOX-Protokoll kommt es zu einem Einsatz von Oxaliplatin, gefolgt von Folsäure und Fluoruracil (van Loon und Venook, 2011). Beim FOLFIRI-Protokoll wird Oxaliplatin durch Irinotecan ersetzt (Tournigand et al., 2004). Ein etwas neueres Schema ist XELOX, bei dem mit einer Kombination aus Capecitabin (eine „Prodrug“ von 5-FU) und Oxaliplatin behandelt wird; dabei zeigte sich eine hohe Wirksamkeit bei gleichzeitig guter Verträglichkeit (Cassidy et al., 2004). Bei allen Varianten handelt es sich um adjuvante Behandlungsmöglichkeiten, die postoperativ genutzt werden, um übriggebliebene Karzinomzellen zu eliminieren. Auch hier besteht in manchen Fällen die Möglichkeit einer Doppeltherapie mit Strahlentherapie vor der Operation, um den Tumor zu verkleinern und die Rezidivrate zu senken.

Zielgerichtete Therapien

Die Erweiterung der konventionellen Chemotherapie-Regime um zielgerichtete Therapien führte zu einer weiteren Verbesserung des tumorspezifischen Überlebens und des Gesamtüberlebens der Patienten. Abzielend auf tumorspezifische Merkmale der Karzinomzellen versprechen diese Therapien eine Steigerung des Ansprechens bei Reduzierung der Nebenwirkungen.

Ein Ansatzpunkt der zielgerichteten Therapien ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Wird EGFR durch Antikörper (z. B. Cetuximab und Panitumumab) blockiert, so inhibiert dies das Wachstum und die Ausbreitung von Karzinomzellen (Wong, 2005).

1.1.6. EGFR – „epidermal growth factor receptor“

Die Aktivierung der Tyrosinkinase-Rezeptor (RTK)-Signalisierung kann durch Mutationen erfolgen. Diese treten relativ häufig und bereits in frühen Stadien der Karzinogenese auf (Fearon und Vogelstein, 1990). Dieser bisher unterschätzte Mechanismus der Karzinogenese wurde mit der Tumorgenese und Metastasierung verknüpft (Pinho und Reis, 2015). Einer dieser Rezeptoren ist der EGFR.

Die epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Familie bildet das erste Glied einer komplexen Signalübertragungskaskade. Diese ist unter anderem für die Zellproliferation, das Überleben, die Adhäsion, die Migration und die Differenzierung essentiell (Yarden, 2001).

Die ERBB-Familie umfasst vier verschiedene Rezeptoren: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 und HER4/ErbB-4. Der EGF-Rezeptor ist eine Rezeptor-gekoppelte Tyrosinkinase mit einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Eine Ligandenbindung an EGFR, HER3 oder HER4 führt zu einer Formierung von aktiven Hetero-Oligomeren. HER2 hingegen geht keine direkte Ligandenbindung ein, wohl aber eine funktionelle heterodimere Bindung mit anderen HER-Molekülen. Eine Anzahl von unterschiedlichen Liganden, einschließlich der EGF-ähnlichen Moleküle, des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- α und Neuregulinen, aktivieren den Rezeptor durch Bindung an die extrazelluläre Domäne. Dies aktiviert wiederum die Tyrosinkinase-Aktivität der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors (Yarden, 2001). Bei der Bindung an Liganden formt der EGFR entweder ein Homodimer oder ein Heterodimer mit anderen Familienmitgliedern, was zu einer EGFR-Autophosphorylierung an multiplen Tyrosin-Resten der C-terminalen Domäne führt (Abe, Kuroda, Hirose, Watanabe, Nakano und Handa, 2006). Dies hat eine Aktivierung verschiedener Signalwege zur Folge. Hierzu zählen der RAS/RAF/ERK-Signalweg, der zur Proliferation und Migration der Zellen führt, und der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, der das Zellwachstum, das Überleben und die Resistenz gegen Apoptose fördert. Die intrazellulären Domänen der Rezeptordimere fungieren durch die Phosphorylierung als Phosphotyrosin-Gerüst und aktivieren so die nachgeschalteten Signalleitungssysteme (Abbildung 3; Steelman et al., 2011).

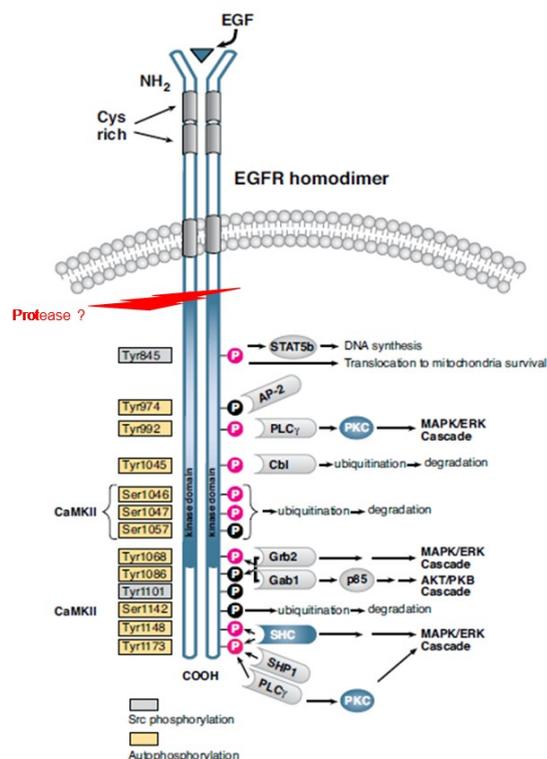


Abbildung 3: Aufbau des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR)

Die schematische Darstellung des EGFR zeigt seine Aktivierung, welche über die Tyrosinkinaseaktivität eine Autophosphorylierung im Inneren des EGFR auslöst. Dies führt zur Aktivierung der MAPK/ERK- und PI3K/AKT-Signalwege (Cell signaling EGFR XP Antibody Datasheet, 2014).

Es zeigte sich, dass erhöhte Aktivitäten der Mitglieder dieser Rezeptorfamilie eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumorzellen spielen (Yarden, 2001). Eine gesteigerte Expression von EGFR konnte in verschiedenen bösartigen Tumoren festgestellt werden, unter anderem bei Erkrankungen der Lunge, der Blase und der Brust (Scagliotti, Selvaggi, Novello und Hirsch, 2004). Aufgrund dieser Tatsache stellen Arzneimittel, die in der Lage sind, den EGFR-Signalweg zu hemmen, eine bedeutende Therapiemöglichkeit dar (Herbst und Bunn, 2003). So wird Cetuximab, ein gegen den EGFR gerichteter Antikörper, bereits seit Jahren im kolorektalen Karzinom eingesetzt (Jonker et al., 2007).

Die Aktivierung des EGFR kann auch durch Änderungen in der Glykosylierung oder Änderungen der Zusammensetzung der verzweigten Zuckerrestmuster reguliert werden. Beim EGFR handelt es sich um ein Glykoprotein, welches 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen enthält (Ullrich et al., 1984). Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass das natürlich vorkommende Antibiotikum Tunicamycin die Glykosylierung des EGFR hemmt. Dadurch verändert sich die EGFR-Konformation sowie die Phosphorylierung (Fernandes, Cohen und Bishayee, 2001). Aus diesen Eigenschaften kann ER-Stress mit einhergehender ER-bezogener Apoptose resultieren (Ling, Perez-Soler und Haigentz, 2009).

Aber auch komplexe Kohlenhydrataddukte (wie Ganglioside) oder Enzyme, welche endständige Zuckerreste (wie Sialidasen) modifizieren, können die ERBB-Signalisierung inhibieren (Guo, Johnson, Randolph, Lee und Pierce, 2009). Aberrante oder defekte N-Glykosylierung von Mitgliedern der ERBB-Familie kann daher eine neue Regulationsebene der menschlichen Kanzerogenese darstellen (Pinho und Reis, 2015). Allerdings ist die Verbindung zwischen Enzymen, welche die Glykosylierung des EGFR im endoplasmatischen Retikulum (ER) und in der frühen Karzinogenese katalysieren, bislang unbekannt.

1.1.7. Therapieresistenz durch Mutationen

Es zeigte sich, dass spezielle Mutationen des *RAS*-Gens, wie *BRAF* oder *KRAS*, welches abwärts des EGFR-Signalwegs liegt, dafür sorgen, dass eine Anti-EGFR-Therapie wirkungslos bleibt. Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des EGFR-RAS-Signalweges und damit zu einer erhöhten Zellteilung (Markman, Javier Ramos, Capdevila und Tabernero, 2010). Ist dies der Fall, kann eine Anti-Angiogenese-Therapie eingesetzt werden. Einer der wichtigsten Wirkstoffe ist hier Bevacizumab (Avastin). Dieser Angiogenesehemmer hat die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) als Ziel. Durch Inaktivierung der Wachstumsfaktoren wird die Bildung neuer Blutgefäße unterbunden und der Tumor somit von seiner Nährstoffzufuhr abgetrennt (Grothey und Allegra, 2012).

Die Erweiterung der herkömmlichen Chemotherapie um zielgerichtete Therapeutika wie Cetuximab und Bevacizumab wird durch Mutationen in Genen, die Teile der Signalkaskaden der Zielstrukturen kodieren, jedoch unterbunden. So kann durch intrinsische oder erworbene Mutationen in den GFRs („growth factor receptors“) oder in den nachgeschalteten Signalproteinen, wie KRAS, PI3K oder BRAF, ein Therapieansprechen ausbleiben (Lièvre et al., 2006; Karapetis et al., 2008). Ein spezielles Beispiel beim kolorektalen Karzinom ist die Resistenz gegen Anti-EGFR-Therapien in Tumoren mit einer KRAS-Mutation, aber auch NRAS- und HRAS-Mutationen können zu Therapieversagen führen (Soulières et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Mutation im KRAS-Gen keinen Nutzen durch eine zusätzliche Behandlung mit Cetuximab haben. Patienten mit KRAS-Wildtyp hingegen haben über die Zeit gesehen eine deutlich bessere Überlebenschance (Karapetis et al., 2008). Auch eine Behandlung mit Panitimumab bleibt bei Vorliegen einer KRAS-Mutation erfolglos (Soulières et al., 2010).

Eine Hemmung der Angiogenese ist ein Teil des Antitumoreffekts von Bevacizumab. Eine Resistenz dagegen kommt unter anderem durch eine Reaktivierung der proangiogenetischen Faktoren über alternative Wege zustande. So steigern resistente Tumore die Produktion der VEGFR („receptors for vascular endothelial growth factor“), was als Stimulator der Neovaskularisierung wirkt, um so die Versorgung des Tumors zu sichern (Viloria-Petit et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass eine Kombination von VEGF-Inhibitoren und Cetuximab einen größeren Behandlungseffekt hat als jede der Therapieformen für sich und zwar sowohl auf das Tumorstadium als auch auf die Induktion der Apoptose (Jung et al., 2002). Neben Mutationen im Signalweg spielen Dysregulation der EGFR-Internalisierung und Degradation ebenso eine Rolle bei der Cetuximab-Resistenz wie eine erhöhte Aktivierung anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs). Dies konnte im NSCLC-Modell („Non-Small Cell Lung Cancer“) gezeigt werden (Wheeler et al., 2008). Dabei kommt es zu einer Hochregulierung der HER-Proteine („Human epidermal growth factor receptor“) EGFR, HER2 und HER3. Des Weiteren konnte eine Resistenz in NSCLC-Zellen durch eine Aktivierung des nachgeschalteten AKT-Signalweges gezeigt werden, die durch eine Degradation von PTEN („Phosphatase and Tensin homolog“) hervorgerufen wurde (Kim et al., 2010/2). Aufgrund dieser häufig auftretenden Mutationen, ca. 30 % bis 40 % der KRK-Patienten besitzen eine KRAS-Mutation, sind molekularbiologische Analysen zur Aufklärung der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen und Entwicklungen alternativer Behandlungsmöglichkeiten nötig (Normanno, Tejpar, Morgillo, De Luca, Van Cutsem und Ciardiello, 2009). Die Identifizierung neuer Zielgene und/oder deren Produkte sind wichtige Voraussetzungen, um das Therapieversagen beim kolorektalen Karzinom zu minimieren oder sogar verhindern zu können.

1.2. Biomarker

1.2.1. Bedeutung von Biomarkern für Diagnose und Therapie

Bislang beruht die klinische Entscheidungsfindung fast ausschließlich auf anatomischen Stadien sowie histomorphologischen Parametern (Brierley, Gospodarowicz und Wittekind, 2016). Molekulare Marker, sogenannte Biomarker, hingegen finden in der therapeutischen Entscheidungsfindung derzeit nur selten Anwendung. Daher sind detaillierte Studien der rezidivierenden molekularen Veränderung, ihrer Wirkungsweise und ihres Einflusses als prognostische oder prädiktive Marker von hoher Bedeutung. Bei Biomarkern kann es sich um Zellen, Gene oder deren Produkte, wie Enzyme oder Hormone, handeln. Biomarker sind folglich messbare Parameter biologischer Prozesse, die es ermöglichen, diagnostische oder prognostische Aussagen zu treffen. Im Bereich der Tumorerkrankung werden Biomarker im Allgemeinen als Tumormarker bezeichnet. Tumormarker können einen Hinweis auf einen Tumor geben, da sie entweder ausschließlich bei einer Tumorerkrankung vorliegen oder im Vergleich zu einem gesunden Menschen in verstärktem Maße exprimiert werden. Es handelt sich bei den bisher erforschten Tumormarkern meist um Glykoproteine. Tumormarker werden jedoch selten zur Diagnosestellung angewendet, da viele in hohem Maße unspezifisch sind; sie spielen vor allem eine Rolle als Verlaufparameter und werden nur selten zur Differenzierung bei unklaren Primärtumoren herangezogen (Sharma, 2009).

Als Tumormarker haben in den letzten Jahren zunehmend Gene und deren Produkte an Bedeutung gewonnen, die an Transport- und Wachstumsprozessen der Zellen beteiligt sind (Metha et al., 2010). Dazu zählt auch der HER2-Rezeptor. Es wurden spezifische Inhibitoren dieses Rezeptors entwickelt, um das Wachstum des Tumors zu verlangsamen. Eine Mutation im *KRAS*-Gen macht ein Ansprechen dieser Kinase-Inhibitor-Therapie aber zunichte (Karapetis et al., 2008). Nach Allegra et al. (2009) ist davon auszugehen, dass mutiertes *KRAS* als Mediator im EGFR-Signalweg fungiert und somit auch bei Hemmung seine Aktivität behält (Allegra et al., 2009). Tumormarker dienen aber nicht alleine zur Identifikation des Tumors, idealerweise ist gleichzeitig auch eine Nutzung des Markers als mögliches Ziel für ein Arzneimittel angestrebt.

1.2.2. TUSC3 – „Tumor Suppressor Candidate 3“

Ein weiterer möglicher Tumorsuppressor und Tumormarker ist das Gen „*tumor suppressor candidate 3*“, auch *TUSC3* oder *N33* genannt. Es ist auf Chromosom 8p22 lokalisiert, wobei es sich um eine genomische Region handelt, die bei unterschiedlichen Tumorentitäten (u.a. Lunge, Brust, Prostata) sehr früh verändert wird oder in Karzinomzelllinien epigenetisch durch Hypermethylierung stillgelegt werden kann (Arbieva et al., 2000; Bova, MacGrogan, Levy, Pin, Bookstein und Isaacs, 1996; Cooke,

Pole, Chin, Ellis, Caldas und Edwards, 2008; Lerebours et al., 1999; MacGrogan, Levy, Bova, Isaacs und Bookstein, 1996). Eine Genexpression von TUSC3-mRNA findet in nicht-lymphatischen Organen (Lunge, Leber, Dickdarm) statt. Dabei wird sie in zwei Varianten transkribiert: Die längere Isoform enthält eine aktive Thioredoxin-Domäne; bei der kürzeren Variante hingegen wurde im Rahmen verschiedener Untersuchungen eine dysfunktionale Thioredoxin-ähnliche Domäne festgestellt (Mohorko, Owen, Malojčić, Brozzo, Aebi und Glockshuber, 2014; Schulz et al., 2009). Ein Verlust der TUSC3-Expression scheint mit negativen Folgen einher zu gehen. So konnte ein Effekt auf die gesteigerte Entwicklung einer Lymphknoten-Metastasierung gezeigt werden (Guervós et al., 2007), aber auch ein Einfluss auf das Überleben der Zellen bei einem Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Pils et al., 2005).

Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass die Methylierung von *TUSC3* im kolorektalen Karzinom auch mit dem Alter korreliert (Ahuja, Li, Mohan, Baylin und Issa, 1998; Shen et al., 2007). Ein möglicher Grund dafür ist, dass epigenetische Modifikationen, wie eine altersbedingte Methylierung, zu einem Felddefekt im Kolon beitragen. Da die Methylierung frühzeitig auftritt und funktionell mit der Karzinogenese verknüpft ist, bietet sich damit die Möglichkeit, Biomarker zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, das individuelle Neoplasierisiko abzuschätzen (Belshaw et al., 2008).

Anfängliche Untersuchungen konnten keine Verbindung zwischen der Methylierung von *TUSC3* und APC/WNT-, RAS/RAF- oder P53-Signalwegen im kolorektalen Karzinom zeigen (Suehiro, 2008). Tänzer ermittelte 2012 in seiner Dissertation jedoch bei einer Untersuchung von 63 Patienten eine signifikante Korrelation zwischen *TUSC3*-Methylierung und einer Kombination von *APC*- und *TP53*-Mutationen. Die Untersuchungen von Tänzer (2012) ergaben, dass nur bei einer kleinen Gruppe von KRK-Patienten (ca. 30–40 %) eine *TUSC3*-Methylierung vorlag. Diese Tatsache ist von einem einzelnen Marker zu erwarten. Außerdem konnte Tänzer (2012) eine *TUSC3*-Methylierung auch in gesundem Epithelgewebe nachweisen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich um einen altersabhängigen Methylierungsfelddefekt handelt. Die in den Tumoren ermittelten Protein-Expressionsniveaus korrelierten invers mit dem gefundenen Methylierungsgrad. Auf diese Tatsache deutet außerdem eine Gruppe (ca. 30 %) von *TUSC3*-negativen Tumoren hin. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es sich bei *TUSC3* um ein Tumorsuppressorgen handelt. Tänzer (2012) geht davon aus, dass *TUSC3* eine Rolle bei frühen Ereignissen der Tumorentstehung hat.

Das *TUSC3*-Protein ist eine der sieben Untereinheiten des Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplexes und am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert (Mohorko, Glockshuber und Aebi, 2011). Die Oligosaccharyltransferase katalysiert den Transfer eines vorgefertigten Oligosaccharids von einem Dolicholpyrophosphat-gebundenen Oligosaccharid-Donor auf den Asparaginrest der Glykosylierungs-

Akzeptorstelle eines Proteins, welches gerade neu gebildet wird (Shrimal, Cherepanova und Gilmore, 2015).

TUSC3 zeigt eine hohe Homologie zur ost3p-Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes der Hefe (Mohorko et al., 2011). Dabei handelt es sich um einen Membranprotein-Komplex, welcher die N-Glykosylierung von Proteinen am endoplasmatischen Retikulum katalysiert. Dies deutet darauf hin, dass TUSC3 membrangebunden ist (Kelleher und Gilmore, 2006).

Die Expression beider OST-Komplexe ist in menschlichen Zellen notwendig, um eine vollständige Glykosylierung des N-Glykoproteoms zu erreichen, und ist somit wichtig für die ubiquitäre Zellfunktion (Aebi, 2013). Dies wurde durch die jüngste Entdeckung bei Patienten mit neuen Formen von angeborenen Störungen der Glykosylierung-I (CDG-1) verdeutlicht. Diese werden durch Mutationen in den *STT3A*- oder *STT3B*-Genen verursacht, welche die Expression von *STT3A* oder *STT3B* reduzieren, aber nicht eliminieren (Cherepanova und Gilmore, 2016). Bei *STT3* handelt es sich um eine hochkonservierte katalytische Untereinheit von OST. Diese transferiert Oligosaccharide auf die Asparaginreste von Sequenzen in naszierenden Glykoproteinen. Die *STT3A*-Isoform des OST liegt neben dem Proteintranslokationskanal, um die co-translationale Glykosylierung von N-Glykosylierungsstellen an naszierenden Ketten zu gewährleisten, während *STT3B* die posttranslationale Glykosylierung der Stellen vermittelt, die sich dem *STT3A*-Komplex entziehen (Shrimal, Ng, Losfeld, Gilmore und Freeze, 2013).

Aufgrund der Beteiligung der Oligosaccharyltransferase wird davon ausgegangen, dass auch TUSC3 eine Funktion bei der N-Glykosylierung von membrangebundenen und sekretorischen Proteinen ausübt, denn die N-Glykosylierung von GFRs wie EGFR/HER1 oder IGFR (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor) garantiert einen ordnungsgemäßen co-translationalen Einbau von Transmembranproteinen in die ER-Membran sowie den Transport vom ER zum Golgi und einen stabilen Einbau in die Plasmamembran (Zhen, Capriolo und Staros, 2003). Des Weiteren garantiert sie Ligandensensitivität und Endozytose sowie den lysosomalen Abbau oder die endosomale Regeneration („recycling“) von GFRs. Glykosylierungsmuster sind an vielen biologischen Signalprozessen beteiligt. Sie zeichnen sich durch ihre Spezifität aus, und ihre Biosynthese ist eine bedeutsame posttranslationale Modifikation von Proteinen (Jorissen, Walker, Pouliot, Garrett, Ward und Burgess, 2003).

Eine detaillierte, strukturelle Analyse der Wechselwirkungen zwischen TUSC3 und definierten Peptidsubstraten auf atomarer Ebene wies auf eine Rolle von TUSC3 bei der selektiven Glykosylierung von Zielproteinen hin, die potentiell an verschiedenen TUSC3-assoziierten Phänotypen beteiligt sind (Mohorko et al., 2011). Bei der N-Glykosylierung handelt es sich um eine der häufigsten und

fundamentalsten posttranslationalen Modifikationen von eukaryotischen Proteinen. Diese Veränderung kommt durch eine veränderte Faltung von Proteinen zustande und soll sie so vor dem Abbau schützen und gleichzeitig deren Funktion und ihre immunogene Aktivität regulieren.

N-Glykosylierung von Proteinen am ER ist ein komplexer Prozess, der fest mit der richtigen Faltung von naszierenden Peptiden sowie der Qualitätskontrolle verknüpft ist. Eine defekte Funktion des ER-Glykosylierungsprozesses oder extrinsische Umweltreize können Veränderungen in der ER-Struktur und -Funktion auslösen, die als ER-Stress bezeichnet werden. Reaktionen auf ER-Stress beinhalten eine Reihe von komplexen Signalwegen, die zu einer Änderung von Zell-Phänotypen führen (Gardner, Pincus, Gotthardt, Gallagher und Walter, 2013). Es ist bekannt, dass die N-Glykosylierung von Proteinen mit der Entwicklung und Progression von Karzinomen assoziiert ist (Stowell, Ju und Cummings, 2015). Die intrinsischen molekularen Mechanismen, die zu veränderten Glykosylierungsprofilen und klinisch relevanten Phänotypen führen, einschließlich der Rolle von TUSC3, bleiben jedoch unklar (Kratochvilova et al., 2015).

Vor einigen Jahren wurde die Struktur von TUSC3 mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt und publiziert. Diese zeigte, welche Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes TUSC3 darstellt (Abbildung 4; Mohorko et al., 2014). In Prostatakarzinomzellen wurde TUSC3 mit der Antwort auf ER-Stress assoziiert; auch wurde gezeigt, dass TUSC3 bei dieser Tumorentität das Tumorentität *in vivo* und *in vitro* hemmt (Horak et al., 2014). Vaňhara et al. (2013) zeigten, dass TUSC3 in Ovarialkarzinomzellen die Proliferation und Migration hemmt; ein Phänomen, welches mit einem veränderten N-Glykan-Gehalt verbunden ist (Vaňhara et al., 2013). TUSC3 ist auch an der Aufnahme von Magnesiumionen beteiligt. Dieser Prozess geschieht zellulär durch die Plasmamembran (Zhou und Clapham, 2009).

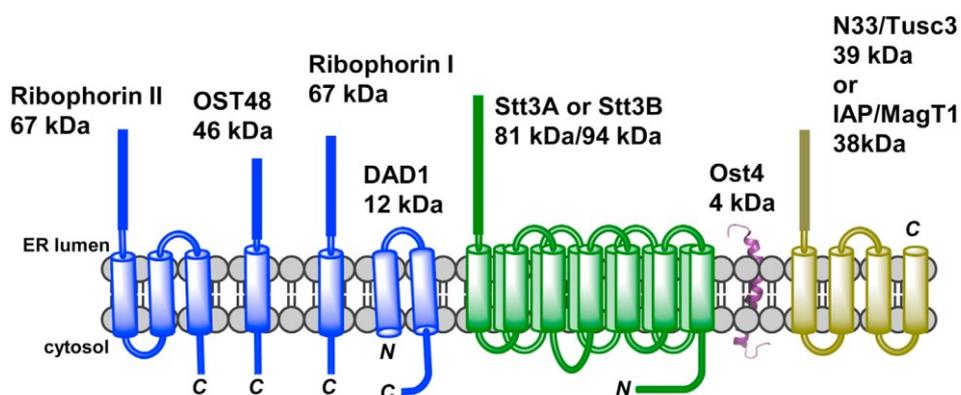


Abbildung 4: Zusammensetzung des humanen Oligosaccharyltransferase-Komplexes

Schematische Darstellung der Untereinheiten des Oligosaccharyltransferase-Komplexes. Er besteht aus sieben Untereinheiten und liegt in vier verschiedenen Isoformen vor (Mohorko et al., 2014).

Kratochvilova et al. (2015) zeigten in ihrer *in vitro*-Studie, dass Prostata- und Ovarialkarzinomzellen, denen TUSC3 fehlt und die durch Serumentzug gestresst wurden, in der Lage sind, angetrieben durch den AKT-Signalweg eine effektive Migration in Wundheilungstests durchzuführen. Sie folgerten, dass die kumulative Wirkung der TUSC3-Stillegung und das extrinsische Mikromilieu des Tumors die ER-Stress-Antwort auslösen. Dies könnte die phänotypischen Veränderungen auslösen, die an der EMT (Epithelial-mesenchymale Transition) und Tumordissemination bei Ovarialkarzinomzellen beobachtet wurden. Somit bestätigte sich der Tumorsuppressor-Charakter von TUSC3 *in vivo*. Trotz der intrinsischen Heterogenität der verwendeten Zelllinien führte der Verlust von TUSC3 zu einer früheren Tumorentwicklung und größeren Tumormassen (Kratochvilova et al., 2015). Somit wurde zum ersten Mal für das Ovarialkarzinom gezeigt, dass TUSC3 an unterschiedlichen molekularbiologischen Regulationsmechanismen beteiligt ist.

Pils et al. (2005) wiesen nach, dass die Expression von TUSC3 in einem fortgeschrittenen Stadium des Ovarialkarzinoms signifikant reduziert ist. Weiter zeigte sich eine niedrige Expressionsrate von TUSC3 durch eine TUSC3-Promotor-Hypermethylierung. Daraus resultierend ergibt sich, dass der Methylierungsstatus des TUSC3-Promotors einen wichtigen und signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie und allgemeine Überleben von Patienten mit Ovarialkarzinom hat (Pils et al., 2013). Im Pankreaskarzinom stellte sich heraus, dass in verschiedenen untersuchten Zelllinien eine Reduzierung des mRNA-Gehalts von *TUSC3* vorlag, was sich ebenfalls auf Proteinebene widerspiegelte (Fan et al., 2016). Diese verminderte TUSC3-Expression korreliert prognostisch mit einem schlechten Krankheitsverlauf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zellen, in denen *TUSC3* stillgelegt wurde, einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollzellen entwickelten. Dabei suggerierten *in vitro*-Tests mit Zelllinien und *in vivo*-Tests für TUSC3 eine Rolle als Tumorsuppressor in frühen Stadien und während der Progression von Pankreaskarzinomen (Fan et al., 2016).

Die Folgen einer homozygoten Deletion von *TUSC3* beim Menschen, welche vermutlich aufgrund von Defekten in der embryonalen Entwicklung geschieht, sind ein erhöhter Blutdruck, vermehrte Eiweißausscheidungen während der Schwangerschaft (Präeklampsie) und geistige Unterentwicklung sowie kognitive Defekte (Alexander, Bey, Whitcutt und Gear, 1976; Garshasbi et al., 2008).

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass TUSC3 an der N-Glykosylierung von EGFR beteiligt ist. Darüber hinaus liegen aus vorangegangenen Arbeiten verschiedene Hinweise vor, dass TUSC3 als Tumorsuppressor fungiert. Die genaue Funktion von TUSC3 beim kolorektalen Karzinom ist bisher hingegen unerforscht. Es wurde jedoch folgendes Modell der Tumorsuppression entwickelt (Abbildung 5). In der gesunden Zelle liegt TUSC3 am ER und spielt eine Rolle bei der N-Glykosylierung. Diese sorgt für einen korrekten Einbau des EGFR in die Membran. Auch dessen Abbau und Transportstrom werden kontrolliert. Es liegt eine Sensitivität gegenüber der Therapie vor, und die Zelle kann in Apoptose

gehen. Im Tumor wird TUSC3 nicht mehr exprimiert. Damit erfolgt keine N-Glykosylierung mehr und somit auch keine Kontrolle von EGFR. Der EGFR kann nun in den Kern transportiert werden. Im Kern interagiert er mit den STAT-Transkriptionsfaktoren und wirkt als transkriptioneller Co-Aktivator für pro-karzinogene Gene. Dies führt zu einer Therapieresistenz und einem Wachstum und Überleben der Karzinomzelle.

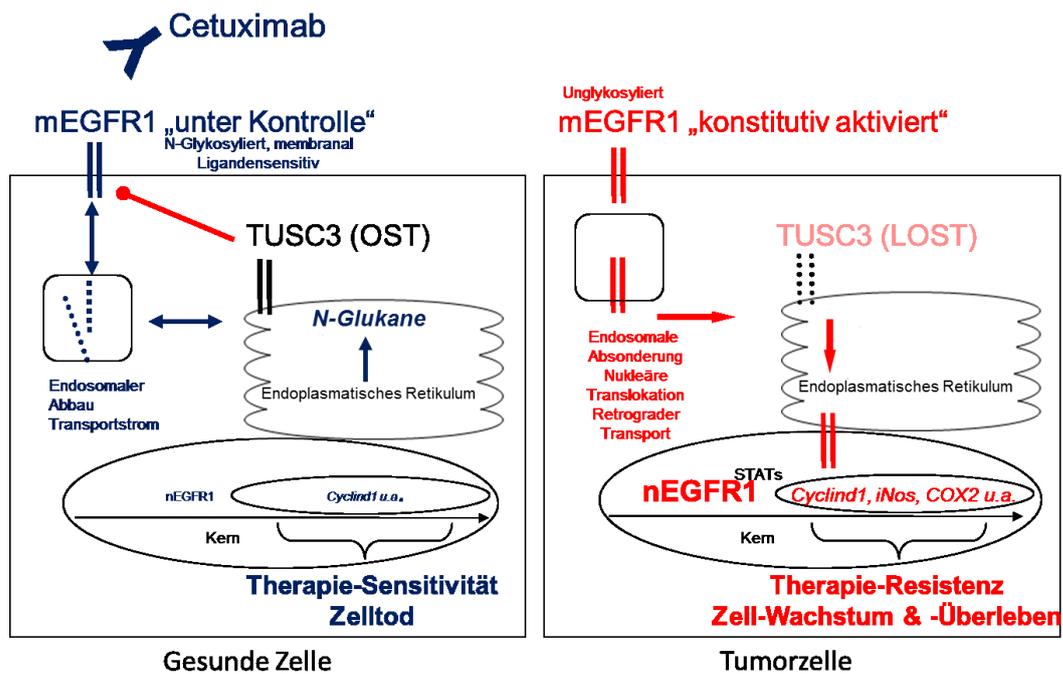


Abbildung 5: Modell der Funktion des Tumorsuppressorkandidaten 3 (TUSC3)

Schematische Darstellung der Funktion und des Mechanismus von TUSC3 in der gesunden Zelle (links) und in der Tumorzelle (rechts). TUSC3 kontrolliert die Aktivität, Stabilität und Lokalisation von EGFR/HER1 (Burgermeister, 2017).

1.3. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation, Expression, Funktion und klinische Bedeutung des Tumorsuppressor-Kandidaten-3 (TUSC3/N33) in KRK-Zellen und -Geweben genauer untersucht werden. Die spezifischen Ziele dieser Dissertation lassen sich in vier Gruppen unterteilen.

(1) Die epigenetische Regulation von TUSC3:

TUSC3 ist auf Chromosom 8p22 lokalisiert. Dabei handelt es sich um eine genomische Region, die beim humanen Karzinom (KRK, Lunge, Prostata, Brust) häufig eliminiert oder durch Hypermethylierung epigenetisch abgeschaltet wird. Daher galt es, zu Beginn der Arbeit die Methylierung des TUSC3-Promotors zu bestimmen. Diese Untersuchung erfolgte über MethyLight-Analyse sowie „Next Generation Sequencing“, mit deren Hilfe der Methylierungsgrad der Gewebeproben der einzelnen Patienten bestimmt wurde. Des Weiteren wurde der Einfluss des Methylierungsgrades auf die Expression des endogenen TUSC3-Proteins in den Gewebeproben untersucht.

(2) Die Funktion von TUSC3 im onkogenen Signaling am Beispiel des EGFR/HER1:

Zur Aufklärung der Funktion von TUSC3 im onkogenen Signaling wurde EGFR/HER1 als Ziel gewählt, da er zur ERBB-Familie gehört, die über das RTK-Signaling dazu beiträgt, dass es im kolorektalen Karzinom zu Zellproliferation sowie zum Überleben der Krebszellen kommt. Es galt dabei den Einfluss von TUSC3 auf das „downstream signaling“, die Phosphorylierung, und das Aufkommen des EGFR in den verschiedenen Zellkompartimenten zu untersuchen. Die Analyse erfolgte mittels „Western Blot“ mit unterschiedlichen spezifischen EGFR-Antikörpern sowie mittels FACS-Analyse. Für die spezielle Untersuchung des EGFR im Nukleus wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Weiter sollte dabei auch der Einfluss auf die Signalweiterleitung zu einem späteren Zeitpunkt des Signalweges (p-AKT, p-ERK1/2) sowie auf andere Signalkaskade (TopFlash, SRE, HRE, PPRE) analysiert werden. Zusätzlich sollte die Möglichkeit einer Verbindung zwischen TUSC3 und der N-Glykosylierung mittels Tunicamycin untersucht werden.

(3) Lokalisation von TUSC3, sowie dessen Einfluss auf Proliferation und Apoptose:

Es liegen zahlreiche Hinweise vor, dass TUSC3 einen Teil der Oligosaccharyltransferase darstellt und am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Mohorko et al., 2011; Vaňhara et al., 2013). Da dies bisher aber noch nicht in der Kolonkarzinomzelle gezeigt werden konnte, erfolgte eine Überprüfung der Lokalisation von TUSC3 durch Immunfluoreszenzmarkierung mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Da zuvor gezeigt wurde, dass TUSC3 das EGFR-Signaling inhibiert, sollte im Anschluss der Blick auf spezifische Karzinommerkmale gerichtet werden. Zu diesen zählen unter anderem Änderungen der

Proliferation und Apoptose. Beide werden dabei durch das EGFR-Signaling reguliert. Die Untersuchung des Einflusses von TUSC3 auf die Proliferation und das Überleben der Karzinomzellen erfolgte mittels MTT-Test. Für die Analyse des Einflusses auf die Apoptose wurden „Western Blots“ durchgeführt.

(4) Translationale Relevanz von TUSC3 als Tumormarker (in Korrelation zu Patientendaten):

Nicht zuletzt galt es die klinische Relevanz von TUSC3 zu prüfen. Insbesondere im Zusammenhang mit der Therapieresistenz gegenüber Cetuximab wurde der Frage nachgegangen, inwiefern TUSC3 möglicherweise als Tumormarker genutzt werden könnte. Diese Fragestellung galt es in einem eigenen Versuch zu untersuchen. Hierzu wurden Gewebeschnitte von Patienten, die bereits mit Cetuximab behandelt wurden, immunhistochemisch angefärbt, um TUSC3 zu lokalisieren.

2. Material & Methoden

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden die eingesetzten Methoden und verwendeten Materialien beschrieben. Eine genaue Übersicht der Herstellerangaben aller Geräte und Materialien ist den Tabellen T1 und T2 im Anhang zu entnehmen.

2.1. Lösungen und Puffer

2.1.1. Analyse von DNA

TAE-Puffer

Für die Durchführung von Agarosegelen zur qualitativen Analyse von DNA wurde eine 50 × TAE-Puffer-Stammlösung hergestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des 50 × TAE-Puffers

Komponenten
Tris 2 M
Eisessig 1 M
EDTA 50 mM

Alle Komponenten wurden in H₂O gelöst und der pH-Wert wurde auf pH 8,0 (HCl) eingestellt.

1 × TAE-Puffer wurden anhand einer 1:50-Verdünnung des 50 × TAE-Puffers mit bidest. H₂O hergestellt.

2.1.2. Analyse von Proteinen

Transfer-/Laufpuffer

Für die Durchführung eines „Western Blots“ wurden folgende Puffer und Lösungen benötigt:

Tabelle 4: Zusammensetzung des 10 × Transfer-/Laufpuffers

Komponenten	Menge für 2 Liter Lösung
Glycin	288 g
TRIS (Ultra rein)	60 g

1 × Laufpuffer und 1 × Transferpuffer wurden nach folgenden Tabellen hergestellt:

Tabelle 5: Zusammensetzung des 1 × Laufpuffers

Komponenten	Volumen
10 × Transfer-/Laufpuffer	100 ml
10 % SDS	10 ml
bidest. H ₂ O	890 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des 1 × Transferpuffers

Komponenten	Volumen
10 × Transfer-/Laufpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
bidest. H ₂ O	700 ml

T-PBS-Puffer

Bei der Durchführung der „Western Blots“ wurde T-PBS-Puffer zur Zugabe des Antikörpers sowie zum Waschen benötigt. Er setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 7: Zusammensetzung des T-PBS-Puffers

Komponenten	Volumen
10 × PBS	100 ml
Tween 20	1 ml
bidest. H ₂ O	899 ml

5 × SDS-Ladepuffer

Die Proteinproben für den „Western Blot“ wurden mit einem 5 × SDS-Ladepuffer versetzt. Dieser diente zum einen dazu, die Proben zu beschweren und so für ein besseres Einsinken in die Taschen zu sorgen, zum anderen wurde durch den Puffer der pH-Wert der Probe stabilisiert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des 5 × SDS-Ladepuffers

Komponenten	Menge für 10 Milliliter Lösung
Tris 1 M	0,625 ml
SDS ultra	1 g
2-Mercaptoethanol	0,5 ml
Glycerin	5 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
bidest. H ₂ O	3,875 ml

2.1.3. Subzelluläre Fraktionierung

HL-/HS-Puffer

Für die subzelluläre Fraktionierung wurde für den ersten Schritt, die hypotone Lyse, der HL-Puffer benötigt. Zur Extraktion der Kernfraktion wurde ein Puffer mit einer hohen Salzkonzentration verwendet (HS-Puffer).

Tabelle 9: Zusammensetzung des HL-Puffers

Komponenten	Volumen (per 50 ml)
TRIS-HCl pH 7,4 (1 M)	1 ml
EDTA (0,5 M)	0,2 ml
MgCl ₂ (1 M)	0,1 ml
Natriumorthovanadat	0,5 ml
DTT	0,5 ml
Proteaseinhibitoren (cOmplete™; Roche)	1 Tablette
bidest. H ₂ O	47,7 ml

Zur Herstellung des HS-Puffers wurden zu 10 ml HL-Puffer 900 µl NaCl (5 M) gegeben.

2.1.4. Protein-Lysepuffer (Gewebe)

Zur Extraktion der Proteine aus Gewebe wurde ein Lysepuffer (Tabelle 10) verwendet. Die Proben wurden in Lysepuffer homogenisiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden sie für 10 min bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Sigma) zentrifugiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Protein-Lysepuffers

Komponenten	Volumen (per 50 ml)
HEPES pH 7,4 (1 M)	1 ml
EDTA (0,5 M)	0,1 ml
β -Glycerophosphat (1 M)	2,5 ml
Glycerin	5 ml
Triton-X-100	0,5 ml
bidest. H ₂ O	40,9 ml

Vor der Verwendung wurden zu je 10 ml des Lysepuffers 10 μ l DTT (1 M), 200 μ l Natriumorthovanadat (100 mM) sowie ein Viertel einer Proteaseinhibitoren-Tablette (cComplete™) hinzugegeben.

2.2. Proben aus Patientengewebe

Bei den verwendeten Gewebeproben handelte es sich um Proben von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es wurde sowohl Tumorgewebe als auch im umliegenden Bereich gesundes Gewebe (Normalgewebe) resektiert und direkt nach der Entnahme mit flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren. Die Gewebeproben stammten von 20 Patienten aus dem Uniklinikum Mannheim und wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, jung (\leq 47 Jahre; n=10) und alt (\geq 85 Jahre; n=10). Zur Durchführung der Versuche wurden die Gewebestücke in N₂ gelegt. Es wurde mit einem sterilen Skalpell ein ca. 1 mm³ großes Stück abgeschnitten. Der Rest der Probe wurde direkt wieder in N₂ überführt und dann bei -80 °C gelagert.

2.3. Proben aus Zelllinien

Alle verwendeten humanen Zelllinien, die in dieser Arbeit genutzt wurden, wurden kommerziell bezogen. Die Zelllinien HT29, SW480 und HCT116 wurden von der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), die Zelllinien HEK293T, DLD1 und LOVO von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) käuflich erworben.

HCT116 sind Zellen des kolorektalen Karzinoms. Sie haben eine Mutation in Kodon 13 des *KRAS*-Protoonkogens. SW480-, DLD1-, LOVO- und HT29-Zellen sind kolorektale Adenokarzinom-Zelllinien. SW480-Zellen tragen eine Mutation in Kodon 12 des *KRAS*-Protoonkogens. Des Weiteren wurden HEK293T-Zellen verwendet, welche aus der Niere stammen und das Simian-Virus 40 (SV40) T-Antigen exprimieren.

Die Zellen wurden in 75 cm³ Zellkulturflaschen (Greiner) kultiviert und für die unterschiedlichen Versuche in speziellen Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät. Dazu wurde, außer für die DLD1-Zellen, DMEM-Medium (High Glucose, Gibco) verwendet, welches mit 10 % FBS (Fetal Bovine Serum; Thermo Fisher), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1 % L-Glutamin (Gibco) supplementiert wurde. Für die DLD1 Zellen wurde RPMI-Medium (Gibco) verwendet, das ebenfalls mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin supplementiert wurde. Die Zellen wurden in einem 37 °C/5 % CO₂-Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS (Gibco) gewaschen und mit Trypsin (Gibco) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung in neue Zellkulturflaschen oder -schalen aufgeteilt.

2.4. Transfektion

Um die Funktionsweise von TUSC3 zu untersuchen, wurde in vielen Versuchen eine Überexpression von TUSC3 oder ein „Knockdown“ von TUSC3 mittels siRNA durchgeführt. Bei einem „Knockdown“ handelt es sich um die Verminderung der Genexpression eines bestimmten Gens mittels RNA-Interferenz oder kompetitiver Inhibierung. Für die Überexpression wurden die ausgesäten Zellen mit einem TUSC3-Plasmid transfiziert. Zur Kontrolle wurde ein Leervektor (pTarget, pT) - oder SPARC-Plasmid genutzt. Für die Transfektion in einer 6-„well“-Platte wurden 2000 ng Plasmid eingesetzt, bei größeren Schalen (15 cm) wurde die Plasmidmenge verdoppelt. Für den Transfektionsansatz wurde die entsprechende Menge DNA mit 250 µl DMEM-Medium (ohne Zusätze) gemischt. Außerdem wurden 6 µl Turbofect mit 250 µl DMEM-Medium (ohne Zusätze) gemischt. Anschließend wurden der Ansatz mit der DNA und der Ansatz mit Turbofect vereinigt. Das 500 µl-Gemisch wurde für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, dann auf die Zellen getropft und für 4-6 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gewechselt wurde. Zur besseren Detektion des TUSC3-Proteins wurde ein Flag-Epitop an TUSC3 angehängt, um es mit Flag-Antikörpern nachweisen zu können.

Für den siRNA „Knockdown“ wurde wie bei der Überexpression verfahren, jedoch wurde anstelle des TUSC3-Plasmids 5 µl siRNA-TUSC3 (siTUSC3) (Dharmacon) bzw. eine unspezifische siRNA als Kontrolle verwendet.

2.5. Gewinnung von DNA/RNA/Protein

Zur Extraktion der DNA aus Gewebeproben wurde ein Stück (ca. 1 mm³) mit einem sterilen Skalpell aus der Gesamtprobe herausgeschnitten und dann für ca. 30 Sekunden gemörsert bis das Gewebestück merklich zerkleinert war. Die Extraktion von DNA fand anschließend mit Hilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach dem im Kit beigefügten Protokoll statt.

Für die Extraktion von DNA aus Zellen wurden die jeweiligen Zellen mit ATL-Puffer von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA nach beigefügtem Protokoll mit Hilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) extrahiert. Die extrahierte DNA wurde in 35 µl Nuklease-freiem Wasser (Promega) aufgenommen und die Konzentration sowie die Reinheit der Proben wurden mittels Nanodrop (Thermo Fisher) bestimmt.

Die Extraktion von RNA erfolgte sowohl aus dem Gewebe als auch aus den Zellen mit Hilfe des PeqGold Total RNA Kits (PepLab) nach Herstellerprotokoll. Das Gewebestück wurde zuvor unter Verwendung von flüssigem Stickstoff gemörsert oder mit einem elektrischen Homogenisierer zerkleinert. Als Zwischenschritt der Extraktion wurde zusätzlich ein DNase I-Verdau (Qiagen) für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde in 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Promega) aufgenommen und die Konzentration und Reinheit der Proben wurden mittels Nanodrop (Thermo Fisher) bestimmt.

Für die Proteinextraktion aus adhären Zellen wurde der Protein-Lysepuffer (Tabelle 10) verwendet. Nach Zugabe des Puffers wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Schale gekratzt und mit einem Ultraschall-Homogenisierer (Sonifier, Branson) beschallt, um die Zellen aufzuschließen. Danach wurden sie bei 4 °C für 10 min bei 15.300 rpm zentrifugiert, um die Zelldebris zu pellettieren. Der im Überstand enthaltene Proteinextrakt wurde abpipettiert.

Zur Extraktion der Proteine aus Gewebe wurde der Protein-Lysepuffer (Tabelle 10), supplementiert mit DTT, Natriumorthovanadat und Proteaseinhibitoren-Tablette (cOmplete™), verwendet. Die Proben wurden mittels Ultraschall-Homogenisierer homogenisiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 15.300 rpm zentrifugiert und der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen abgenommen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl Probe mit 20 µl H₂O gemischt und davon 10 µl in eine 96-„well“ Platte gegeben. Anschließend wurden 200 µl einer 1:50-Mischung von Reagenz A und B aus dem Pierce™ BCA Protein-Test-Kit (Thermo Fisher) hinzugegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurde die Konzentration mit dem „Microplate Reader“ (Tecan) bestimmt. Zur genauen Berechnung der einzusetzenden Menge an Proteinen für den „Western Blot“ wurde außerdem eine Eichgerade angesetzt.

2.6. MethyLight-Polymerasekettenreaktion

Bei der MethyLight-Analyse handelt es sich um einen hochsensitiven Test, bei dem der Grad der DNA-Methylierung gemessen wird. Der Test ist in der Lage, kleinste Mengen an methylierter DNA in der Gegenwart eines Überschusses an unmethylierter DNA zu detektieren (Eads et al., 2000). MethyLight ist eine methylierungsspezifische quantitative real-time-PCR-Methode, die im Wesentlichen auf einer fluoreszierenden Reportersonde basiert. Eine sequenzspezifische Sonde ist mit einem fluoreszierenden „Quencher“ am 3'-Ende und einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 5'-Ende markiert. Der „Quencher“ absorbiert die Erregungsenergie aus einem Fluorophor und leitet die Energie als Wärme ab. Wenn der „Quencher“ sich am Fluorophor befindet, unterdrückt er dessen Lichtemission. In diesem Versuch wurde der „Quencher“ BHQ1 (Black hole quencher one, Eurofins) verwendet, welcher das ganze sichtbare Spektrum löscht. Bei dem Reporterfarbstoff handelte es sich um FAM (6-Carboxyfluorescein), der Licht bei 520 nm emittiert und einen blaugrünen Farbstoff produziert, der SYBR Green I vom Spektrum ähnelt. Die Sonde hybridisiert an die zuvor bisulfitkonvertierte DNA und wird durch die 5'-Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase während der Elongationsphase der PCR geschnitten, wodurch der „Quencher“ und der Reporter-Farbstoff getrennt werden und ein Fluoreszenz-Signal entsteht.

2.6.1. Bisulfitkonvertierung

In der Epigenetik kommt es zu einer Inaktivierung von Genen durch DNA-Methylierung. Dabei betrifft die Methylierung hauptsächlich Cytosine an der C5-Position in CpG-Dinukleotiden. Behandelt man die DNA mit Bisulfit, so führt die Bisulfit-Reaktion dazu, dass unmethylierte Cytosine zu Uracilen konvertiert werden, während 5-Methylcytosin nicht mit Bisulfit reagiert.

Der erste Schritt der MethyLight-PCR war demnach eine Bisulfitkonvertierung an 1-2 µg genomischer DNA mit Hilfe des EpiTect-Bisulfite-Conversion-Kit (Qiagen), die nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.6.2. MethyLight-Analyse

Die relativen Konzentrationen der DNA werden bestimmt, indem die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl auf einer logarithmischen Skala aufgetragen wird. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einer Probe den Schwellenwert zur Detektion der Fluoreszenz überschreitet, wird als der Zyklus-Grenzwert Ct oder Kreuzungspunkt Cp bezeichnet. Die Ergebnisse werden zur Analyse mit einer Standardkurve verglichen. In dieser Arbeit wurde hierfür eine serielle Verdünnung (unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256) eines vollständig methylierten und bisulfitkonvertierten DNA-Standards (Qiagen) genutzt. Die gemessene Menge an methylierter DNA aus dem Zielgen wird durch die Menge an DNA eines nicht-

methylierten Referenzgens (typischerweise ACTB, β -Actin) geteilt. Die Konzentration wird als das Verhältnis von Ziel- zu Referenzgen in der gleichen Probe ausgedrückt. Dieses Verhältnis wird dann mit dem unverdünnten, vollständig methylierten DNA-Standard als Kalibrator normalisiert und mit 100 multipliziert, um einen Prozentwert zu erhalten, das sogenannte Prozent-Methylierungsverhältnis (percentage of methylation ratio, PMR).

Für den MethyLight-Versuch in dieser Arbeit wurden das EpiTect MethyLight-PCR Kit (Qiagen), speziell hergestellte TUSC3-Primer sowie eine fluoreszierende Sonde verwendet. Die Primer enthielten mindestens zwei CpG-Dinukleotide und grenzten an CpG-Inseln. Als Kontrolle für die eingesetzte DNA wurden Sonden und Primer genutzt, die keine CpG-Dinukleotide enthielten (ACTB-Gen). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle T3 aufgeführt. Die MethyLight-PCR-Bedingungen sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 11: Bedingungen des PCR-Programms der MethyLight-PCR

Temperatur	Dauer	Schritt
95 °C	600 s	Aktivierung
95 °C	15 s	Denaturierung
60 °C	30 s	Primer-Annealing
72 °C	10 s	Elongation (Datenerfassung)

} 50 x

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer BLAST³ hergestellt. Die Durchführung der MethyLight-PCR erfolgte mit einem RT-qPCR-Gerät (7900HT, Applied Biosystems) mit der passenden Software (SDS 2.4).

2.7. „Next Generation Sequencing“

Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenzierung genutzt, um die Nukleotid-Abfolge eines bestimmten DNA-Moleküls zu ermitteln. Die gebräuchlichste Methode hierfür ist die sogenannte Kettenabbruchmethode oder auch Didesoxymethode des britischen Biochemikers Frederick Sanger (Sanger und Coulsen, 1975).

Zu Beginn wird hierbei die mittels PCR vervielfältigte DNA durch Erwärmen auf 95 °C denaturiert, um dadurch einzelsträngige DNA zu erhalten. Daraufhin bindet ein hinzugegebener Primer an einen komplementären Sequenzabschnitt der Einzelstrang-DNA, der als Startpunkt der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase dient.

³ NCBI, Primer BLAST. Abgerufen am 13.05.16 von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Die Besonderheit dieser Methode ist, dass zusätzlich zu den dNTPs bei der Sequenzierung auch ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphate) im Reaktionsgemisch enthalten sind. Diese können zufällig an jeder beliebigen Stelle eingebaut werden und so einen Kettenabbruch auslösen. Da sich am dritten C-Atom der Ribose ein Wasserstoffatom (H) statt einer Hydroxy-Gruppe (OH) befindet, sorgt der Einbau eines ddNTP dafür, dass keine Bindung an der C3-Position mehr möglich ist und die Kette abbricht (Abbildung 6) (Siegenthaler, 2006).

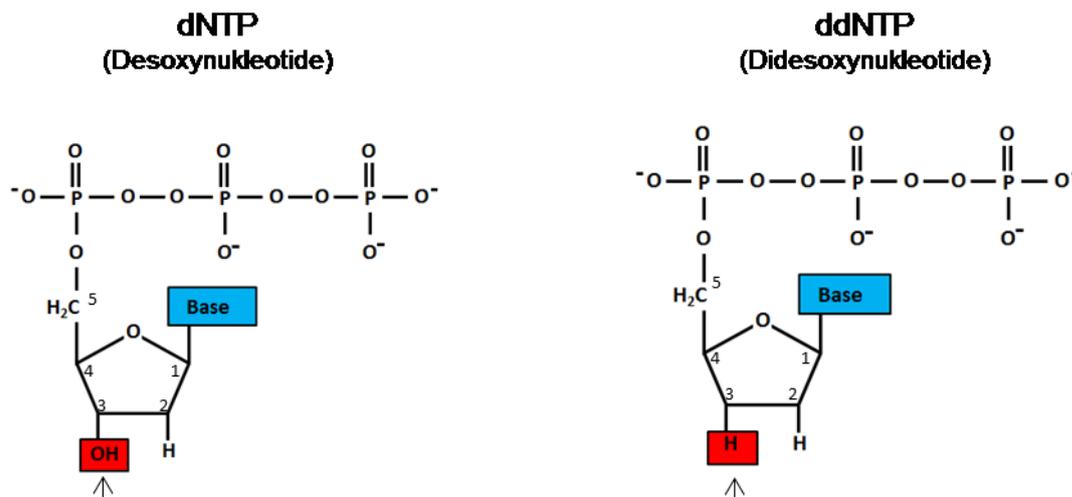


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Nucleotid-Typen dNTP und ddNTP

Links: Desoxynucleotid (dNTP) am C3-Atom der Ribose mit einer OH-Gruppe. **Rechts:** Didesoxynucleotid (ddNTP) am C3-Atom des Ribose-Ringes mit einem Wasserstoffatom (H).

Durch den Kettenabbruch kommt es dazu, dass am Ende viele DNA-Sequenzen mit unterschiedlichen Längen vorhanden sind. Diese besitzen bis zum Abbruch alle dieselbe Abfolge von Basen, was damit zusammenhängt, dass nur ein Primer verwendet wurde. Zusätzlich tragen die unterschiedlichen ddNTPs einen individuellen Fluoreszenzfarbstoff, durch den ermittelt werden kann, welche Base sich am Ende jeder abgebrochenen Kette befindet. In einem Elektropherogramm wird die jeweilige Base dann als entsprechende Spitze dargestellt. Ein grün markiertes ddGTP, welches zu einem Kettenabbruch geführt hat, spiegelt sich dann als grüne Spitze wider (Murken, 2006).

Auch das „Next Generation Sequencing“ läuft nach diesem Grundschemata ab. Allerdings geschieht dies mit einem erheblich höheren Durchsatz. So ist es möglich, mehrere Millionen von kurzen Nucleotidabfolgen in kürzester Zeit zu sequenzieren. Da es sich um ein Matrix-basiertes Sequenzieren handelt, ist es möglich, viel mehr Proben parallel zu sequenzieren. Dies macht das gesamte Verfahren kostengünstiger und schneller als die klassische Sanger-Sequenzierung. Die Methode, die in dieser Arbeit genutzt wurde, war die „sequencing-by-synthesis“-Methode (Illumina). Die Sequenzierung läuft auf einem Glasobjektträger (FlowCell) ab, indem die fragmentierte Matrizen-DNA („template-DNA“)

mit Hilfe spezieller Adaptoren kovalent an den Objektträger gebunden wird. Beginnend beim Startmolekül werden Gruppen aus identischen Molekülen gebildet („bridge-amplification“). Die Sequenzierung verläuft zyklusweise unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Dabei wird pro Zyklus genau ein Nukleotid komplementär zur Matrizen-DNA eingebaut. Darauf folgend kommt es zu einer Abspaltung der Fluoreszenzgruppe und ein Lichtsignal kann detektiert werden. Außerdem wird die Terminatorgruppe entfernt, um im folgenden Zyklus ein weiteres Nukleotid einbauen zu können. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit einer „paired-end“-Sequenzierung. Dabei können beide Fragmentenden sequenziert werden, um so qualitative Daten zu erhalten. Es wird von beiden Seiten mit einer Leseweite von 100 bp bis 250 bp sequenziert. Dabei können lange DNA-Nukleotidabfolgen überlappen, kurze DNA-Abfolgen können hingegen durch einen nicht sequenzierten DNA-Teil („Insert“) getrennt sein.

Für diesen Versuch wurde aus Tumor- und Nichttumorproben von Patienten die DNA extrahiert und daraus mit Hilfe speziell hergestellter Primer (Tabelle T3) PCR-Amplikons mit einer Länge von ca. 300 bp generiert. An die Amplikons wurde ein NGS-Adapter ligiert und dann das „MiSeq-ultra-deep-sequencing“-Protokoll durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde das Illumina MiSeq-Sequenzierungssystem unter Verwendung des „MiSeq Reagent Kit v3“ (Illumina) genutzt. Für die Präparation der DNA-Sammlung wurde das „TruSeq Nano DNA Library Preparation Kit“ (Illumina) verwendet. Es wurden jeweils die Herstelleranleitungen befolgt; die eingesetzte Menge des PCR Produktes für die Ligation betrug 150 ng. Die Coverage betrug ca. 20.000 Reads je Probe, allerdings konnten davon jeweils nur etwa 1 % bis 3 % der Sequenzierungsreads in einer genomischen Referenzsequenz abgebildet werden. Die Auswertung des NGS-Versuches erfolgte mit dem Programm „BiQ Analyzer HiMod“, welches speziell für die Analyse von Hochdurchsatz-Bisulfit-Amplikon-Sequenzierungsdaten entwickelt wurde und die Methylierungsrate an den einzelnen CpGs visuell als Heatmap und in reellen Zahlen ausgibt. Die NGS-Durchführung sowie die Datenanalyse wurden von Maximilian Mossner an der III. Medizinischen Klinik der Universität Mannheim vorgenommen.

2.8. „Western Blot“

Die „Western Blot“-Methode dient dazu, ein bestimmtes Protein in einem Proteingemisch, z. B. einer Zelle, nachzuweisen. Ein „Western Blot“ besteht aus drei Abschnitten. Zu Beginn werden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im zweiten Schritt werden die Proteine mittels elektrischer Spannung auf eine solide Oberfläche transferiert. Hierzu wird im Allgemeinen eine Nitrozellulose-Membran verwendet. Nachfolgend werden die Zielproteine mit

Hilfe eines mono- oder polyklonalen Primär- und Sekundärantikörpers markiert. Die Banden können dann durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden (Mahmood und Yang, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine aus adhären Zellen mittels SDS-Lyse isoliert und anschließend deren Konzentration bestimmt (siehe 2.5.). Je Probe wurde jeweils eine konstante Proteinmenge von 30 ng auf das Gel aufgetragen. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Expression des Zielproteins innerhalb der einzelnen Spuren vergleichbar ist. Die Proben wurden mit Ladepuffer (5 × SDS-Ladepuffer) versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 10 min bei 99 °C auf einem Heizblock (Eppendorf) erhitzt. Durch die Denaturierung der Proteine wird ermöglicht, dass das Detergenz SDS besser binden kann, wodurch denaturierte Proteine eine negative Netto-Ladung erhalten und anhand ihres Molekulargewichts in dem SDS-Gel aufgetrennt werden, indem sie sich in einem elektrischen Feld von der Kathode (Negativ-Pol) zur Anode (Plus-Pol) bewegen. Proteine mit geringerem Molekulargewicht wandern hierbei schneller durch die Gelmatrix als Proteine mit einem hohen Molekulargewicht (Mahmood und Yang, 2012). Als Kontrolle und zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Proteinstandard (Page Ruler, Thermo Fisher) auf das Gel aufgetragen.

Ein SDS-PAGE-Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Es setzt sich aus H₂O, Acrylamid (Carl Roth), Tris-HCl, 10 % SDS, 10 % APS (Carl Roth) und Temed (Carl Roth) zusammen. Beim Trenngel wird Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 und beim Sammelgel Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5 verwendet. Das Sammelgel dient dazu, die Proben zu konzentrieren, so dass diese auf derselben Höhe in das Trenngel einlaufen, bevor die Proteine dort dann nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lässt sich je nach Größe der zu untersuchenden Proteine variieren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15 mA für 1,5 h. Im Anschluss erfolgt der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran. Der genaue Aufbau war hierbei folgender: Ein Schwamm, zwei Zellulosepapiere (GE Healthcare), das Polyacrylamidgel, die Nitrocellulosemembran (GE Healthcare), erneut zwei Zellulosepapiere und zum Schluss ein weiterer Schwamm wurden für den Transfer zusammengesetzt. Die Membran lag dabei zwischen dem Gel und der Anode. An Letztere wurde für 1 h eine Spannung von 100 V angelegt, wodurch der Proteintransfer erfolgte. Zur Kontrolle, ob die Proteine erfolgreich auf die Membran übertragen wurden, wurde jede Membran kurz mit Ponceau S (Sigma Aldrich) rot angefärbt. Je nach Antikörper (Tabelle 12) wurde die Membran für 1 h in 5 % Milchpulver (Carl Roth) oder 5 % BSA (Merck Millipore) geblockt, wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert werden sollten. Danach wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 ebenfalls in 5 % Milchpulver, 5 % BSA oder T-PBS hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper abgenommen und die Membran dreimal für 10 min mit T-PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:5000) für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal für 10 min

mit T-PBS gewaschen. Abschließend wurde eine Entwicklerlösung auf die Membran gegeben, bestehend aus je 1 ml Lösung A und Lösung B, um die Proteine detektieren zu können. Lösung A bestand aus 3 µl H₂O₂ in 5 ml Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) und Lösung B aus 50 µl Luminol (Sigma Aldrich) und 22 µl Cumarin (Sigma Aldrich) in 5 ml Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5). Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe des Fusion Solo-Bildgebungsgeräts und die Auswertung der Banden mit der ImageJ-Software.

Tabelle 12: Übersichtsliste aller verwendeten Antikörper

Antikörper	Größe	Blockierlösung	1. AK Lösung	2. Antikörper	2. AK Lösung
TUSC3 (Novus)	39 kDa	5 % Milch	5 % Milch	Anti-Kaninchen	5 % Milch
TUSC3 Ziege (Novus)	39 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Ziege	T-PBS
EGFR (CS)	175 kDa	5 % Milch	5 % BSA	Anti-Kaninchen	5 % Milch
EGFR (Thermo)	175 kDa	5 % Milch	5 % Milch	Anti-Maus	5 % Milch
EGFR-FITC (SC)	175 kDa	5 % Milch	5 % Milch	Anti-Maus	5 % Milch
P-EGFR (CS)	175 kDa	5 % Milch	5 % BSA	Anti-Kaninchen	5 % Milch
P-AKT (T308) (CS)	60 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Kaninchen	T-PBS
P-ERK (CS)	42/44 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Kaninchen	T-PBS
P-ERK (SC)	42/44 kDa	5 % BSA	5 % BSA	Anti-Maus	5 % BSA
PARP (CS)	89 kDa	5 % Milch	5 % Milch	Anti-Kaninchen	5 % Milch
Transferrin Rezeptor (SC)	85 - 95 kDa	5 % Milch	5 % Milch	Anti-Maus	5 % Milch
Flag CS)		5 % Milch	5 % Milch	Anti-Kaninchen	5 % Milch
Flag (Sigma Aldrich)		5 % Milch	5 % Milch	Anti-Maus	5 % Milch
Actin (SC)	42 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Maus	T-PBS
HSP90 (SC)	90 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Kaninchen	T-PBS
Lamin (SC)	67 kDa	5 % BSA	T-PBS	Anti-Kaninchen	T-PBS

2.9. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-PCR ist eine Methode zum Nachweis von RNA. Sie besteht aus zwei Teilen. Zunächst wird das Enzym Reverse Transkriptase genutzt, um RNA-Moleküle in DNA-Moleküle umzuschreiben. Daraufhin wird eine PCR zur Quantifizierung der DNA-Moleküle durchgeführt.

Der Vorteil hierbei ist die Verwendung von mRNA, aus der durch die Zelle bereits alle Introns, die den kodierenden Bereich unterbrechen, entfernt wurden. Die zu Beginn aus den Zellen extrahierte mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu werden Oligo-d(T)-Primer verwendet, welche aus mehreren Thymin-Basen bestehen und komplementär zum Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Die Transkriptase erkennt dieses Ende, es kommt zu einer Basenpaarung zwischen den Thymin-Basen und dem Poly-A-Schwanz, was dazu führt, dass ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird. Darauffolgend wird der RNA-Strang durch einen weiteren DNA-Strang ersetzt, sodass es zur Bildung einer doppelsträngigen DNA (cDNA) kommt (Clark und Pazdernik, 2009). Die Gesamtausbeute ist abhängig von den Primern und dem RT-Enzym. Neben den Oligo-d(T)s werden auch häufig „Random Hexamers“ für die RNA-Synthese verwendet. Dabei handelt es sich um Primer-Sequenzen, die eine Abfolge sechs zufälliger Oligonukleotide darstellen. Eine Kombination aus beiden Synthesestrategien erhöht sowohl die Empfindlichkeit der Reaktion als auch die Ausbeute an cDNA. Auch ein RNase-Inhibitor ist im Enzym-Gemisch enthalten, welcher die RNA-Degradation verringert. Ein weiteres Enzym ist der RT-Enhancer, der während des RT-Schrittes verunreinigte DNA abbaut. Alle diese Komponenten sind in dem verwendeten Verso cDNA-Kit (Thermo Fischer) enthalten, welches in dieser Arbeit genutzt wurde.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Komponenten aus dem Verso cDNA-Kit für die cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen
5 × cDNA-Synthese-Puffer	4 µl
dNTP-Mix	2 µl
Oligo-d(T)s	1 µl
RT-Enhancer	0,5 µl
Verso Enzyme Mix	0,5 µl
Template (RNA) (1 ng)	1-5 µl
Wasser, Nuklease-frei	auf 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die Versuchsbedingungen für die cDNA-Synthese waren wie folgt: 30 min bei 42 °C, gefolgt von 2 min bei 95 °C.

Die neu synthetisierte cDNA kann nun im zweiten Schritt mittels PCR vervielfältigt werden. Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) ist die am weitesten verbreitete

Methode, um spezielle DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren und zu manipulieren. Sie wurde erstmals 1986 von Mullis, Faloona, Scharf, Saiki, Horn und Erlich beschrieben und hat die Molekularbiologie revolutioniert. Zugrunde liegt dieser heute automatisierten Methode der Gebrauch einer sogenannten *Taq*-DNA-Polymerase, welche thermostabil ist. Diese DNA-Polymerase verlängert einzelsträngige, kurze Oligonukleotide nach Bindung an ein Stück der Template-DNA, was zu einer Amplifizierung des von den Oligonukleotid-Primern flankierten Bereichs der Template-DNA führt. Die Reaktion läuft dabei in einem Thermocycler unter kontrollierten Bedingungen ab. Dabei wird das Reaktionsgemisch wiederholt erhitzt und abgekühlt.

Eine PCR eignet sich unter anderem zum Nachweis von DNA sowohl qualitativ als auch quantitativ (Real-Time PCR). Die Effizienz dieser Methode ist unter anderem davon abhängig, wie gut die DNA vorher aufgereinigt wurde.

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche *Taq*-Polymerasen und Bedingungen getestet; zum einen der GoTaq Green Master Mix (Promega), zum anderen die GoTaq Flexi DNA-Polymerase (Promega).

Tabelle 14: PCR-Ansatz für PCRs mit dem GoTaq Green Master Mix

Komponenten	Volumen
GoTaq Green Master Mix	10 µl
Primer 1 („forward“)	2 µl
Primer 2 („reverse“)	2 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	4 µl
cDNA	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 15: PCR-Ansatz für PCRs mit der GoTaq Flexi DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen
5 × GoTaq Reaction buffer	4 µl
Primer 1 („forward“)	1 µl
Primer 2 („reverse“)	1 µl
dNTPs	1 µl
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	0,5 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	10,5 µl
cDNA	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 16: Bedingungen des PCR-Programms mit dem GoTaq Green Master Mix

Temperatur	Dauer	Schritt	
94 °C	300 s	Initiale Denaturierung	} 25 - 40 x
94 °C	30 s	Denaturierung	
55 °C	30 s	Primer-Annealing	
72 °C	30 s	Elongation	
72 °C	300 s	Finale Elongation	
4 °C	∞	Kühlung	

Tabelle 17: Bedingungen des PCR-Programms mit der GoTaq Flexi DNA-Polymerase

Temperatur	Dauer	Schritt	
95 °C	120 s	Initiale Denaturierung	} 28 x
95 °C	60 s	Denaturierung	
60 °C	60 s	Primer-Annealing	
72 °C	60 s	Elongation	
72 °C	300 s	Finale Elongation	
4 °C	∞	Kühlung	

Um ein besseres Ergebnis zu erzielen, können die Versuchsbedingungen angepasst werden. Die Anzahl der Zyklen, mit denen eine PCR abläuft, kann verändert werden. Wird die Zyklenzahl erhöht, erhöht sich auch die Menge an gewünschtem Produkt, aber gleichzeitig auch das Risiko für ein falschpositives Ergebnis. Die Temperatur zur Hybridisierung der Primer ist entscheidend für deren spezifische Bindung. Die optimale Temperatur lässt sich mittels eines Gradienten ermitteln. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des PCR-Produkts, aber auch von der Wahl der DNA-Polymerase.

2.10. Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR)

Quantitative Real-Time-PCR ist, wie die herkömmliche PCR, eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Zusätzlich wird hier eine Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit ermöglicht. Für diese Methode wird ein spezielles Real-Time-PCR-Gerät (ABI Prism 7900HT) benötigt, das aus einem PCR-Block und einem Fluoreszenzphotometer besteht.

Die Messung der synthetisierten DNA erfolgt mittels Fluoreszenzmessung während der exponentiellen Phase der PCR am Ende eines Zyklus, da nur in dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu der PCR-Produktmenge zu. Für die Fluoreszenz wird eine TaqMan-Sonde verwendet, die an einem Ende mit einem „Quencher“ und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier: SYBR green) markiert ist. Wird die Sonde nun durch die

Taq-Polymerase am 5'-Ende abgebaut, so entfernen sich der „Quencher“ und das Fluorophor voneinander und es wird eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen (Busch, 2010).

Für diese Methode ist es von besonderer Bedeutung, dass die Primer sehr spezifisch binden und nur ein Amplifikationsprodukt bilden, denn der Fluoreszenz-Nachweis erfolgt für jede gebildete DNA. Die Länge von Amplifikationsprodukten bei der quantitativen Real-Time-PCR liegt in der Regel zwischen 100 bp und 200 bp, damit sichergestellt ist, dass die DNA-Polymerase den kompletten Strang synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde die Real-Time-PCR genutzt, um zu überprüfen, ob bestimmte Gene bei Präsenz oder Abwesenheit des Gens *TUSC3* hoch- oder herunterreguliert werden. Dabei wurden Gene genauer untersucht, die bei einem zuvor durchgeführten „Microarray“ als beste Kandidaten identifiziert wurden. Die untersuchten Gene waren *MGAT1*, *MGAT3*, *BAK1* und *BCL2*. *MGAT1* und *MGAT3* sind Proteine, die bei der Chemoresistenz und dem Trimmen von Zucker im ER-Golgi eine Rolle spielen. *BAK1* ist ein pro-apoptotisches Protein und *BCL2* ein anti-apoptotisches Protein. Es wurde für jedes Gen ein spezielles Primerpaar generiert (Anhang: Tabelle T3). Als interne Kontrolle wurde das $\beta 2M$ ($\beta 2$ -Mikroglobulin)-Gen verwendet. Es handelt sich dabei um eine Protein-Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I und findet unter anderem häufig Anwendung als Tumormarker für Leberzellkarzinome und Lymphome (Monteiro et al., 2016).

Zu Beginn wurden je sechs Schalen mit jeweils 500.000 Zellen der Zelllinien SW480, HCT116 und HEK293T ausgesät. Drei Schalen je Zelllinie wurden mit dem *TUSC3*-Plasmid transfiziert (siehe 2.4.) und in einem 37 °C-Brutschrank inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet (siehe 2.5.), RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.). Je nach Zelllinie wurde die DNA mit einer bestimmten Menge H₂O verdünnt (SW480: 20 μ l; HCT116: 30 μ l; HEK293T: 30 μ l). Für die Real-Time-PCR wurde ein Ansatz, bestehend aus 10 μ l Power SYBR Green Master Mix (Qiagen), je 2 μ l 3'- und 5'-Primer und 6 μ l H₂O, hergestellt. Zu 20 μ l des Mastermixes wurden 2 μ l cDNA hinzugegeben. Das Protokoll zur Amplifikation der DNA mittels Real-Time-PCR ist im Folgenden aufgeführt:

Phase 1: 95 °C, 10 min

Phase 2: 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min (40 Zyklen)

Phase 3: 95 °C, 15 s; 60 °C, 15 s; 95 °C, 15 s

Mit Hilfe der Mittelwerte der untersuchten Gene und der Mittelwerte des Kontrollgens ließen sich die Expressionsunterschiede (Verhältnisse) errechnen, die zwischen den transfizierten und nicht transfizierten Proben herrschten. Zuerst wurde der Mittelwert des Kontrollgens vom Mittelwert des untersuchten Gens subtrahiert (Δ Ct). Dann wurde der Mittelwert aller Δ Ct-Werte (Kalibrator) der

analysierten Gene vom ΔCt -Wert jedes einzelnen untersuchten Gens subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Mit Hilfe der Rechnung von $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ließ sich die Änderung jeder Probe, bezogen auf den Kalibrator, errechnen.

2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuresträngen nach ihrer Größe, um anschließend ihre Größe mit den Größen bekannter Stränge vergleichen zu können. Der Grundsatz dieser Methode ist, dass sich Agarosepolymere zu einem Gel vernetzen. Dieses Gel ist von kleinen Poren durchzogen, die umso kleiner sind, je größer die Agarose-Konzentration ist. Zudem sind diese Poren mit einem Laufpuffer gefüllt. Durch ein elektrisches Feld können biologische Moleküle, wie DNA, zur Wanderung durch diese Matrix aus Poren und Flüssigkeit gebracht werden (Reinard, 2010). Dabei werden die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle vom Minus- zum Plus-Pol durch das Gel transportiert. Wie schnell die einzelnen DNA-Fragmente durch das Gel wandern, ist von der Größe der Moleküle abhängig (Wink, 2011). Kleine Moleküle laufen schneller und damit weiter durch das Gel als große Moleküle, da sie besser durch die kleinen Poren passen und somit geringeren Reibungskräften ausgesetzt sind. Um zu kontrollieren, ob die DNA die erwartete Größe besitzt, wurde ein DNA-Marker genutzt, der zusätzlich auf das Gel aufgetragen wurde. Mit Hilfe diesen Markers entstehen Banden bekannter Größe.

Das Gel setzte sich aus LE-Agarose (Biozym) und TAE-Puffer zusammen. Dabei wurden etwa 1 g bis 2 g Agarose in 100 ml Puffer gegeben, um so ein 1%iges bis 2%iges Gel zu erhalten. Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst (Schmelztemperatur von Agarose: 95 °C). Um die DNA später detektieren zu können, wurden zusätzlich 7 μl Ethidiumbromid (Invitrogen) zur Gellösung hinzugegeben. Nachdem die Gele in der Gelkammer ausgehärtet waren, wurden diese mit den PCR-Produkten sowie dem Laufpuffer (6x „DNA Loading Dye“, Thermo Fisher) beladen. Der Laufpuffer diente dazu, die Amplifikate zu beschweren, und zeigte durch seinen Farbstoff die Lauffront während der Elektrophorese an. Dieser wurde bei Verwendung des GoTaq Green Master Mixes nicht benötigt. Als Vergleichsprobe diente der GeneRuler 50 bp DNA-Marker von Thermo Fisher. Die angelegte Spannung betrug 120 V für ca. 45 min. Der Puffer für die Elektrophorese war TAE-Puffer, welcher EDTA (Sigma Aldrich) enthält. EDTA fungiert als Komplexbildner für zweiwertige Ionen (z. B. Mg^{2+}). Viele Nukleasen brauchen diese zweiwertigen Kationen für ihre Aktivität. Demnach ist das EDTA in der Elektrophorese sehr bedeutend, um den Abbau der DNA-Fragmente durch Nukleasen zu hemmen.

Eine Sichtbarmachung der Banden erfolgte mit Hilfe von UV-Licht und dem eingesetzten Ethidiumbromid. Ethidiumbromid-Moleküle im Gel interkalieren zwischen die Basen der DNA, leuchten unter UV-Bestrahlung und ermöglichen so eine Sichtbarmachung der DNA-Fragmente. Diese

DNA-interkalierende Eigenschaft macht Ethidiumbromid allerdings gesundheitsschädlich; so wirkt es unter anderem tetragen, mutagen und karzinogen (Graw, 2015).

2.12. „Microarray“

Die „Microarray“-Technologie ermöglicht den parallelen Nachweis einer großen Menge an DNA-Sequenzen aus einer Probe mit Hilfe eines „Microarray“-Chips. cDNA-„Microarrays“ im Speziellen dienen dem Nachweis der RNA bestimmter Gene. Es gibt zwei Hauptarten von DNA-„Microarrays“: Solche, bei denen cDNA, Oligonukleotide oder Fragmente von PCR-Produkten, die komplementär zur RNA sind, auf das speziell beschichtete Trägermaterial gedruckt werden (50-mere bis 70-mere) („Spotted Microarrays“) und solche, die auf synthetisch hergestellten kurzen Oligonukleotiden (25-mere) beruhen („Oligonukleotid-Microarrays“). „Microarrays“ mit kürzeren Oligonukleotiden haben eine geringere Sensitivität, dafür nimmt die Spezifität mit zunehmender Länge ab (Jansohn und Rothhämel, 2012). Diese Oligonukleotide dienen als Sonden, die an definierten Positionen eines Rasters, z. B. auf Glasträger, aufgebracht werden. Es handelt sich dabei um sogenanntes „Spotting“. Während des „Microarrays“ werden diese DNA-Sonden mit den zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten Ziel-Nukleinsäuren hybridisiert. Wenn die Sequenz der untersuchten Probe zu dem zu analysierenden RNA- oder DNA-Fragment auf dem „Microarray-Chip“ komplementär ist, kommt es zu einer selektiven Hybridisierung der Watson-Crick-Basenpaarung. Eine Detektion wird durch die Markierungen mit bestimmten (Fluoreszenz-) Farbstoffen ermöglicht (Jansohn und Rothhämel, 2012). Die an die Punkte hybridisierten Targets lassen sich sehr leicht mittels Scanner und entsprechender Software analysieren.

Dadurch ist ein „Microarray“ hervorragend geeignet, um das Vorhandensein einer großen Menge unterschiedlicher DNA-Sequenzen auf einer sehr kleinen Fläche gleichzeitig zu analysieren. Neben der Genexpressionsanalyse bietet diese Methode noch weitere Untersuchungsmöglichkeiten. So lässt sich zum Beispiel DNA zur Genotypisierung untersuchen. Außerdem wird sie mittlerweile auch häufiger in Methylierungsstudien eingesetzt, um epigenetische Veränderungen zu untersuchen (Fassbender et al., 2010). Zusätzlich können „Microarrays“ auch der Tumorklassifizierung (Golub et al., 1999; Perou et al., 2000), zur Identifizierung von Molekülen in Stoffwechsel- und Signaltransduktionskaskaden (Hughes et al., 2000) und zur Suche nach bestimmten Zielgenen für medizinische Zwecke dienen.

Die für diesen Versuch benutzten Gen-Trägerplatten (Gene Chip Human Gene 2.0 ST-Array, Affymetrix) tragen eine hochdichte Anordnung von 25-mer-Oligonukleotiden. Jedes untersuchbare Gen ist durch eine Gruppe von mehreren Proben repräsentiert, welche direkt auf der Träger-Oberfläche

synthetisiert werden. Zur zusätzlichen Erfassung möglicher Spleißvarianten wurde ein ST-Array verwendet, bei dem jedes Exon durch ein Oligonukleotid abgedeckt wird. Auf Fehlpaarungs-Oligonukleotide wurde verzichtet, allerdings enthält der Träger zusätzlich eine Gruppe mit Oligonukleotiden zur Abschätzung des Hintergrunds.

Der Vorteil dieser Affymetrix-Chips ist das hohe Maß an Standardisierung und die Qualität, welches in einer sehr guten Reproduzierbarkeit resultiert (Park et al., 2004).

Die Analyse des Expressionsarrays beruht auf einem Nachweis komplementärer RNA (cRNA). Begonnen wird das Verfahren mit der Extraktion von Gesamt-RNA. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden hierzu sechs Schalen mit je 400.000 SW480-Zellen ausgesät. Drei Schalen wurden mit dem TUSC3-Plasmid transfiziert und drei mit dem Leervektor (pTarget). Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion geerntet und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.). Aus dieser cDNA konnte dann mittels *in vitro*-Transkription komplementäre RNA gewonnen werden. Diese cRNA wurde mit Biotin markiert und mit Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Die biotinylierte Antisense-cRNA wurde nach dem Affymetrix-Standard-Markierungsprotokoll mit dem GeneChip® WT Plus Reagent Kit und dem GeneChip® Hybridisation-, Wash- und Stainkit (beide von Affymetrix, Santa Clara, USA) hergestellt. Die nachfolgende Hybridisierung auf dem Chip erfolgte auf einem GeneChip Hybridization oven 640. Die Färbung fand in der GeneChip Fluidics Station 450 statt. Die Chips wurden mit einem GeneChip Scanner 3000 gescannt. Alle verwendeten Geräte stammten von der Affymetrix-Company (Affymetrix, High Wycombe, UK).

Eine benutzerdefinierte CDF-Version 18 auf Basis der ENTREZ-Gendefinitionen wurde verwendet, um die Arrays zu annotieren (Dai et al., 2005). Die Rohwerte der Fluoreszenz-Intensität wurden mittels der Quantil-Normalisierung und der RMA-Hintergrundkorrektur normalisiert (Bolstad, Irizarry, Astrand und Speed, 2003). Ein OneWayANOVA wurde durchgeführt, um die differentielle Genexpression unter Verwendung eines kommerziellen Softwarepakets zu identifizieren (SAS JMP10 Genomics, Version 7, SAS Institute, Cary, NC, USA). Eine falsch-positive Rate von $\alpha = 0,05$ mit FDR-Korrektur (False Discovery Rate) wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz verwendet. Mit Hilfe der Gengruppen-Anreicherungsanalyse (GSEA) wurde bestimmt, ob eine gegebene Gensignatur signifikant innerhalb einer zuvor definierten Gengruppe angereichert ist. Signalwege, die zu bestimmten Zellfunktionen wie Zellzyklus oder Apoptose gehören, wurden aus öffentlichen Datenbanken bezogen (KEGG)⁴. Die Roh- sowie die normalisierten Daten der „Microarray“-Untersuchungen dieser Arbeit sind in der Gene Expression Omnibus Datenbank⁵ (accession No. 18243466) hinterlegt. Ihre Auswertung erfolgte in

⁴Abgerufen am 13.03.16 von <http://www.genome.jp/kegg>

⁵ Abgerufen am 09. 08. 16 von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Sticht (Zentrum für Medizinische Forschung, Universitätsklinikum Mannheim).

2.13. Subzelluläre Fraktionierung

Bei der subzellulären Fraktionierung handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Zellen in einzelne Bestandteile. Dies geschieht mittels Zentrifugation und unter Verwendung von Puffern mit verschiedenen Salzkonzentrationen. Die Salze und Detergenzien dienen der Abtrennung gebundener Proteine aus dem Kern und dem Zytoskelett. Je nach Größe, Dichte und Form setzen sich die unterschiedlichen Bestandteile in einem Zentrifugalkraftfeld unterschiedlich ab. Die Zentrifugation trennt die einzelnen Bestandteile aber nur grob nach ihrer Größe, daher ist sie oft nur ein Teil einer weitergehenden Fraktionierung (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Walter, 2011).

In dem durchgeführten Versuch wurden die Zellen nach der abgeschlossenen Versuchskinetik mittels HL-Puffer gelöst und mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte geschabt. Durch den Puffer erfolgte eine hypotone Lyse. Nach dem Lysieren wurden die Zellen mit einem Ultraschall-Homogenisator für ca. 20 s homogenisiert und anschließend für 5 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt lösliche Proteine aus dem Zytoplasma sowie leichte Membranbestandteile. Das Pellet wurde in HS-Puffer (HL-Puffer mit 900 µl NaCl [5 M] pro 10 ml) resuspendiert, wodurch die Kernfraktion mittels hoher Salzkonzentration extrahiert wurde. Dieses Gemisch wurde für 10 min bei 15.300 rpm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Sigma) zentrifugiert und der Überstand mit den darin enthaltenen löslichen Proteinen des Zellkerns (Nukleoplasma) abgenommen. Das restliche Pellet wurde mit SDS-Puffer lysiert und für ca. 20 s mit Ultraschall aufgeschlossen. Darauf erfolge ein zweiter Zentrifugationsschritt für 10 min bei 15.300 rpm und 4 °C, um die Fraktion mit unlöslicher Matrix, Zytoskelettproteinen, Kernmembranen, DNA, ER und sonstigen unlöslichen Fragmenten zu erhalten (Abbildung 7). Da die Auftrennung von Teilchen mit ähnlicher Sedimentationscharakteristik mit den verfügbaren Rotoren schwierig ist, handelt es sich hierbei jedoch um ein weniger genaues Verfahren.

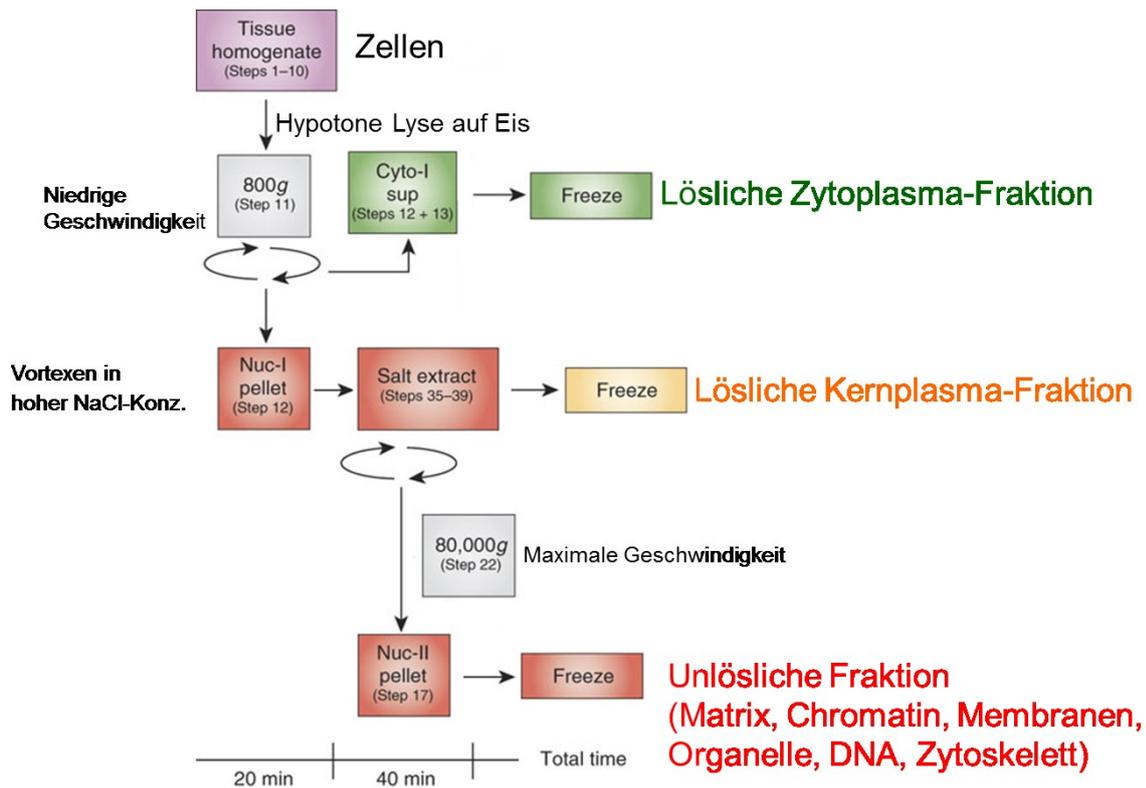


Abbildung 7: Übersicht des Ablaufs der subzellulären Fraktionierung (Cox und Emilie, 2006)

2.14. „Fluorescence activated cell sorter“ (FACS)/Durchflusszytometrie

Der Begriff FACS steht für „fluorescence activated cell sorter“. Es handelt sich dabei um einen geschützten Markennamen eines Geräts zur Durchführung einer Durchflusszytometrie, einer Methode zur Quantifizierung von Einzelzellen und Partikeln in Abhängigkeit von ihrer Größe, Granularität und relativen Fluoreszenzintensität (Renz, 2014).

Die Zellen, welche auf ähnliche Weise wie bei der Immunfluoreszenz markiert werden, fließen durch ein Durchflusszytometer, werden dabei durch eine Kapillare gesaugt und passieren so als Einzelsuspension einen Laserstrahl. Dabei streut die Zelle, proportional zu ihrem gebundenen Antikörper, Licht in unterschiedliche Richtungen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward scatter) hängt hierbei von der Größe, das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards scatter) von der Granularität der Zellen ab (Renz, 2014).

Durch unterschiedliche Streuungsintensitäten und -richtungen lassen sich die gemessenen Zellen unterschiedlichen Populationen zuordnen. Dies geschieht mit Hilfe von Computerprogrammen und Analysen mittels Punktauftragung („Dotplot“).

Die Aussagekraft erhöht sich durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper. Der Laser sorgt dafür, dass die Fluorogene auf ihrer charakteristischen Emissionswellenlänge angeregt werden.

Aufgrund der Intensität der Wellenlänge und der Zusammensetzung des Fluoreszenzlichts ist eine zeitgleiche Detektion verschiedener zellulärer Strukturen möglich.

In dieser Arbeit wurden für die FACS-Versuche SW480- und LOVO-Zellen benutzt. Zum Nachweis des Effektes von TUSC3 auf die N-terminale Domäne des EGFR an der Zelloberfläche wurden jeweils 1,7 Mio. Zellen (Leervektor/transfiziert mit TUSC3-Plasmid) für den Versuch eingesetzt. Diese wurden mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei 37 °C fixiert. Es wurde eine direkte Färbung durch die Verwendung eines EGFR-Antikörpers (1 µg) (Santa Cruz Biotechnology sc-154) für 45 min bei Raumtemperatur vorgenommen, da dieser bereits mit FITC (Fluorescein isothiocyanate) gekoppelt war. Die fixierten Zellen konnten direkt mit 0,5 % BSA geblockt werden. Zur Kalibrierung wurden ungefärbte Zellen herangezogen. Zur Kontrolle wurde ein Transferrinrezeptor-Antikörper verwendet. Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein, welches für den Transport und die Aufnahme von Transferrin-gebundenen Eisenionen in der Zelle verantwortlich ist. Dies geschieht mittels Endozytose. Der Transferrinrezeptor startet wie der EGFR eine Rezeptor-vermittelte Endozytose über spezielle Clathrin-beschichtete Vertiefungen. Da dieser Antikörper mit keinem Farbstoff gekoppelt ist, wurden die Zellen zusätzlich für 30 min bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper inkubiert.

Die Analyse fand am FACS Canto-Durchflusszytometer (BD Bioscience) mit Hilfe der FACS Diva-Software statt. Dabei wurde eine „Dotplot“-Analyse durchgeführt, in welcher der prozentuale Anteil an positiven (gefärbten) Zellen ermittelt wurde.

2.15. Luciferase-Reportergenanalyse

Reportergene können genutzt werden, um die Expression eines bestimmten Gens, welches von Interesse ist und weniger Einfluss auf die Zellkultur oder den Organismus hat, zu untersuchen. Hierbei unterscheidet man zwischen fluoreszenz-basierten Methoden und radioaktiven Methoden, wobei die fluoreszenz-basierten Methoden eine höhere Sensitivität aufweisen und weniger cancerogen sind. Ein Beispiel für einen fluoreszenz-basierten Reportergen-Test ist die Luciferase-Reportergenanalyse, bei der die in einem Testsystem erzeugte Chemilumineszenz gemessen wird, wodurch eine Aussage über die Aktivität der regulativen Elemente gemacht werden kann.

Zu Beginn wird ein Reporterplasmid (z. B. PGL3) in den Zellkern eingeschleust. Auf diesem Plasmid ist der Promoter oder Enhancer eines Gens vor der kodierenden Sequenz der Luciferase kloniert. Das Genprodukt des Luciferasegens stellt dann das Ziel des Screenings dar. Der Promotor bzw. Enhancer ist nun ein selektiver Indikator für Agonisten des natürlichen Aktivators und muss aktiviert werden. Die Aktivitätsmessung des Reportergens erlaubt eine indirekte Ermittlung der Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz unter besonderen Bedingungen. Eine Aktivierung führt zur Synthese von Luciferase.

Gibt man nun Luciferin hinzu, wird dieses durch die Luciferase zu Oxyluciferin umgewandelt, wobei Chemilumineszenz entsteht. Zur Messung von Antagonisten des Zielgens wird die Abnahme der Chemilumineszenz gemessen (Böhm, Klebe und Kubinyi, 2002).

In dieser Arbeit wurden 500.000 HCT116-Zellen mit den folgenden Luciferase-gekoppelten Reporterplasmiden transfiziert: SRE (serum response element), HRE (hypoxia response element), PPRE (PPAR response element) und TopFlash (TCF4/beta-catenin). Das SRE ist eine Sequenzabfolge im Promotor einiger Gene, deren Expression durch Wachstumsfaktoren oder Cytokine stimuliert wird. An das SRE bindet der dimere Transkriptionsfaktor „serum response factor“ (SRF).

Der „Hypoxia-inducible factor-1“ (HIF-1) verstärkt die Transkription und spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Zellantwort auf Sauerstoffmangel (Kaluz et al., 2008). Er sorgt für eine Regulierung des Sauerstoffgehalts in der Zelle. Durch Hypoxie wird die Untereinheit HIF-1 α hochreguliert. Dadurch wird der HIF-1-Komplex stabilisiert und die Expression verschiedener Gene hochreguliert, um das Überleben bei Sauerstoffmangel zu sichern. HIF-1 entfaltet seine Wirkung, indem es an das „hypoxia response element“ (HRE) des Gen-Promotors bindet und dieses transaktiviert.

Eine Aktivierung Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptoren (PPAR) sorgt dafür, dass diese an Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) binden und einen Komplex bilden. Dieser wiederum bindet an das PPRE und sorgt so für eine Induktion spezifischer Gentranskriptionsmuster (Michalik et al., 2006).

TopFlash ist ein Reporterplasmid für TCF4/beta-catenin. Dies sind Transkriptionsfaktoren, die für eine Vermittlung des WNT-Signalwegs sorgen, indem sie den Co-Aktivator Beta-Catenin rekrutieren (Barolo, 2006).

Jedes Reporterplasmid wurde jeweils mit einer Leervektor-Kontrolle oder dem TUSC3-Plasmid co-transfiziert. Nach einer 6-stündigen Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 umgesetzt. Die Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion mit 100 μ l 1 \times Zellkultur-Lyse-Reagenz (Promega) geerntet. Zur Proteinbestimmung wurden 10 μ l Probe und 200 μ l A+B-Mix des Pierce BCA Protein Test Kits verwendet, zur Luciferasemessung 10 μ l Probe und 35 μ l Luciferin (Luciferase Test Reagent, Promega). Die anschließende Messung der Chemilumineszenz erfolgte in einem Tecan M200.

Zur weiteren Kontrolle der Überexpression wurde anstelle des Leervektors und des TUSC3-Plasmids mit siTUSC3 oder Kontroll-siRNA transfiziert, um so den Effekt durch einen „Knockdown“ von TUSC3 untersuchen zu können.

2.16. Immunfluoreszenz (IF)-Methode

Die Immunfluoreszenz-Methode ist eine biochemische Analysemethode, bei der Antigenstrukturen in Zellen und Geweben nachgewiesen werden können. Zur Lokalisierung des Antigens wird ein Fluoreszenzfarbstoff durch Anregung sichtbar gemacht.

Es wird dabei zwischen der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz unterschieden. Bei der direkten Immunfluoreszenz wird ein spezifischer Antikörper, welcher gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, genutzt. Dieser Antikörper ist direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zuerst ein spezifischer, nicht markierter Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen. Als nächster Schritt wird der Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und richtet sich gegen das Immunglobulin der Spezies, in welcher der Erstantikörper hergestellt wurde (Hallbach, 2006).

Letztere Methode wurde verwendet, um die Lokalisation des TUSC3-Proteins im endoplasmatischen Retikulum nachzuweisen. Hierfür wurde ein mausspezifischer TUSC3-Antikörper (Novus) sowie ein Calnexin-Antikörper (Cell Signaling) verwendet, um das endoplasmatische Retikulum zu detektieren. Bei Calnexin handelt es sich um ein Lektin, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (Carl Roth) angefärbt.

Es wurden ca. 100.000 untransfizierte bzw. mit TUSC3-Plasmid transfizierte HEK293T-Zellen in einer 6-„well“-Platte auf ein Deckglaschen aufgetragen und über Nacht zum Anheften bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (Carl Roth) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 200 µl 100 % FBS für 30 min geblockt, um später unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterbinden. Die Membran wurde mit 0,1 % Triton-X-100 (Merck) permeabilisiert. Dann wurden die Zellen über Nacht in 200 µl Antikörperlösung (10 % FBS in PBS) bei 4 °C inkubiert (TUSC3 1:500/Calnexin 1:250). Am nächsten Tag wurde der Zweitantikörper (1:500) in 200 µl Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln hinzugegeben (Alexa Fluor 594 anti mouse /Alexa Fluor 488 anti rabbit) (Invitrogen). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gefärbt, einem Farbstoff, der stark an A-T-reiche Regionen der DNA bindet. Nach der Färbung wurde das Deckglaschen mit einem Tropfen Eindeckmedium (Dako) auf einem Objektträger befestigt.

Die Zellen wurden dann unter einem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und fotografiert. Die Anregung der Zellen und Messung der emittierten Strahlung erfolgte bei unterschiedlichen Wellenlängen. Es wurde zum einen Alexa Fluor 488 genutzt, welche zur Emission einer cyan-grünen Farbe führt, sowie Alexa Fluor 594, welche die Emission einer roten Farbe induziert.

2.17. MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um einen farbbasierten Test, mit dem die Lebensfähigkeit von Zellen bzw. der Lebendzellanteil einer Zellpopulation gemessen werden kann (Mosmann, 1983). Der Test beruht auf der Reaktion des wasserlöslichen gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma Aldrich). Nur lebende Zellen besitzen die Fähigkeit, diesen Farbstoff über eine Reduktion zu spalten. Dies geschieht mit Hilfe der mitochondrialen Dehydrogenasen, welche dafür sorgen, dass der Tetrazolium-Ring gespalten wird und so das wasserunlösliche blau-violette Formazan mit einer maximalen Absorption bei 570 nm entsteht (Hughes und Mehmet, 2003). Je mehr lebende Zellen vorhanden sind, desto größer ist die Bildung von Formazan, was sich in einer höheren Absorption manifestiert.

Der MTT-Test wurde *in vitro* in einer 96-„well“-Platte durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl MTT-Reagenz zu den Zellen gegeben und diese 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde die Reaktion mit 200 µl Solubilisierungslösung (50 ml 10 % SDS + 500 µl HCl 1N) gestoppt und mit Hilfe eines Spektrophotometers die Extinktion des Zellaufschlusses bei 570 nm gemessen.

2.17.1. Proliferations-Test

Für den MTT-Test zur Untersuchung der Proliferation wurden SW480-, HCT116-, HEK293T-, HT29-, DLD1- und LOVO-Zellen mit einer Leervektor-Kontrolle (pT), einem TUSC3-Plasmid, einem SPARC-Plasmid und einer Kombination aus TUSC3- und SPARC-Plasmid transfiziert, um den Einfluss von TUSC3 auf das Zellwachstum zu ermitteln und zu vergleichen. Als Transfektionsreagenz wurde TurboFect (Thermo Fisher) verwendet. Es wurden je 2.000 Zellen pro „well“ ausgesät. Das Zellwachstum wurde mittels MTT über einen Zeitraum von einem Tag bis sieben Tagen ermittelt. Dabei wurde pro Transfektion und Zeitpunkt jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte im Anschluss bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 630 nm in einem Spektrophotometer der Firma Tecan mit Hilfe der iControl-Software.

2.17.2. Zytotoxizitäts-Test

Mit dieser Form des MTT-Tests galt es, die Lebensfähigkeit der Zellen unter dem Einsatz verschiedener Chemotherapeutika in Bezug auf das zusätzliche Vorhandensein von TUSC3 zu untersuchen. Im Versuch zur Chemoresistenz-Antwort wurden jeweils 20.000 SW480- und HCT116-Zellen pro „well“ ausgesät. Wie im Wachstumsversuch wurden diese für 24 h transfiziert und nachfolgend mit

verschiedenen Konzentrationen von 5-Fluoruracil (5-FU, Bendalis), einem Zytostatikum der Chemotherapie, oder Paclitaxel (Fresenius), einem Zytoskelett-Inhibitor, behandelt. Die Konzentrationen der Chemotherapeutika reichten von 0 mM bis 1 mM. Die Messung der Zellviabilität erfolgte 48 h nach Zugabe des Chemotherapeutikums an einem Spektrophotometer.

Des Weiteren wurden SW480-, HCT116-, HEK293T-, HT29-, DLD1- und LOVO-Zellen für 6 h transfiziert und mit einer Kombination aus TNF α (0–50 ng/ml, Roche), bei dem es sich um einen Signalstoff des Immunsystems handelt, und Cycloheximid (CHX, 0,1 μ M, Sigma Aldrich), einem Antibiotikum, inkubiert. Auch hier erfolgte die Zellviabilitätsmessung an einem Spektrophotometer 24 h nach Hinzufügen der Chemotherapeutika.

2.18. Immunhistochemie (IHC)

Wie auch bei der Immunfluoreszenz-Methode handelt es sich bei der Immunhistochemie um eine Methode, bei der Proteine mittels markierter Antikörper visualisiert werden. Sehr häufig werden immunhistochemische Untersuchungen bei histopathologischen Analysen von Tumoren eingesetzt (Büttner und Thomas, 2003).

Somit kann auf einem Gewebeschnitt gezeigt werden, in welchem Gewebe ein bestimmtes Protein exprimiert ist oder in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Eine Auswertung der Schnitte erfolgt dabei unter einem Lichtmikroskop. Die meisten immunhistochemisch nachweisbaren Makromoleküle sind Proteine und Glykoproteine. Oft handelt es sich dabei um Zellbestandteile, die an der Zellmembran, dem Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert sind. Der wichtigste Parameter für den Erfolg dieser Methode ist dabei der Antikörper, welcher gegen das zu untersuchende Gewebeantigen gerichtet ist. Anstelle eines Fluorochroms wird häufig ein Enzym als Detektormolekül eingesetzt (Büttner und Thomas, 2003). Ein oft genutztes Substrat ist 3,3-Diaminobenzidin (DAB), welches zu einer braunen Färbung des Produktes führt. Dieser Effekt entsteht mit Hilfe des Enzyms Peroxidase, welche über die Antikörper am Gewebe gebunden ist. Die Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von H₂O₂ die Umsetzung von DAB zu einem braunen Farbstoff.

Auch hier gibt es die Möglichkeit einer direkten und einer indirekten Färbung. Viel häufiger sind heutzutage jedoch umfangreichere Vielschrittverfahren wie die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Methode), die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (PAP-Methode) oder die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode). Diese Methoden sind zwar komplexer, haben allerdings auch eine höhere Sensitivität (Büttner und Thomas, 2003).

Bei der ABC-Methode wird neben einem ungekoppelten Primärantikörper ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Da Avidin eine äußerst hohe Affinität zu Biotin hat, kann am Biotin ein

großer, enzymhaltiger Verstärkungskomplex binden. Dieser besteht aus mehreren Avidin- und Biotin-Peroxidase-Konjugaten. Pro Gewebeanlagen werden somit mehrere Peroxidasemoleküle gebunden (Büttner und Thomas, 2003).

Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte genutzt. Diese wurden zu Beginn in einer sogenannten „Färbestraße“, bestehend aus Xylol (Carl Roth) und absteigenden Konzentrationen von Ethanol (Sigma Aldrich), entwacht und rehydriert. Die Gewebeschnitte wurden mit Antigen-Demaskierungslösung (Vector) behandelt. Diese sorgt unter zusätzlicher Wärmezufuhr dafür, dass gerade bei Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben die Antigene besser freigelegt und für den Antikörper zugänglich gemacht werden. Daraufhin wurde mit 3 % H₂O₂ (Merck) die endogene Peroxidase-Aktivität gestoppt. Dann wurden die Schnitte für 1 h mit 5 % Ziegen Serum geblockt, bevor bei 4 °C über Nacht der primäre Antikörper (TUSC3 1:250 in 1 % BSA-PBS) auf das Gewebe gegeben wurde. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Zweitantikörper (1:500) bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden sie für 30 min mit ABC-Lösung (Vectastain) versetzt, gefolgt von einer kurzen Inkubation (1-5 min, RT) mit DAB-Lösung (DAB-Puffer, DAB-Substrat + H₂O₂). Zuletzt wurde das Gewebe mit Hämatoxylin (Merck) gegengefärbt (1-10 s) und zur Dehydrierung durchliefen die Gewebeschnitte die „Färbestraße“ in umgekehrter Reihenfolge. Danach wurden einige Tropfen Eukitt auf das Gewebe getropft und die Gewebeschnitte mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.19. Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse („two-way“ ANOVA) und einer Bonferroni-Korrektur. Die zweifaktorielle Varianzanalyse untersucht den Einfluss von zwei verschiedenen kategorisch unabhängigen Variablen auf eine kontinuierliche, abhängige Variable. Dabei zielt sie nicht nur darauf ab, den Haupteffekt jeder unabhängigen Variablen zu beurteilen, sondern auch, ob zwischen ihnen eine Interaktion besteht. Die Bonferroni-Korrektur dient dem Zweck, die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Vergleichen zu neutralisieren. Ergebnisse mit einem p-Wert unterhalb von 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Zur Darstellung der Signifikanz wurden Sterne verwendet (*p<0,05). Wenn die Gruppenanalyse zu keinem Erfolg geführt hatte, wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Diese erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test oder einem zweiseitigen ungepaarten T-Test. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein Homogenitätstest zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Der zweiseitige T-Test prüft anhand der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichprobenwerte, wie sich die Mittelwerte zweier Grundgesamtheiten zueinander verhalten. Die Berechnungen wurden mit GraphPad PRISM 7 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Anstieg der Methylierung im Tumorgewebe bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

Durch vorangegangene Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *TUSC3* auf Chromosom 8p22 lokalisiert ist, einer genomischen Region, die beim humanen Karzinom (KRK, Lunge, Prostata, Brust) häufig eliminiert oder durch Hypermethylierung epigenetisch abgeschaltet wird (Arbieva et al., 2000; Bova et al., 1996; Cooke et al., 2008; Lerebours et al., 1999; MacGrogan et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst die *TUSC3*-Methylierung in KRK Gewebe validiert werden. Dies erfolgte mittels MethyLight-Analyse, für welche Normal- und Tumorgewebeproben von fünf Patienten mit kolorektalem Karzinom resektiert wurde. Die aus den Gewebeproben extrahierte DNA wurde bisulfitkonvertiert und in einer MethyLight-PCR eingesetzt. Hierbei fanden spezifische *TUSC3*-Primer, sowie *ACTB*-spezifische Primer als Kontrolle Verwendung. In Abbildung 8a ist das Resultat der Analyse graphisch dargestellt.

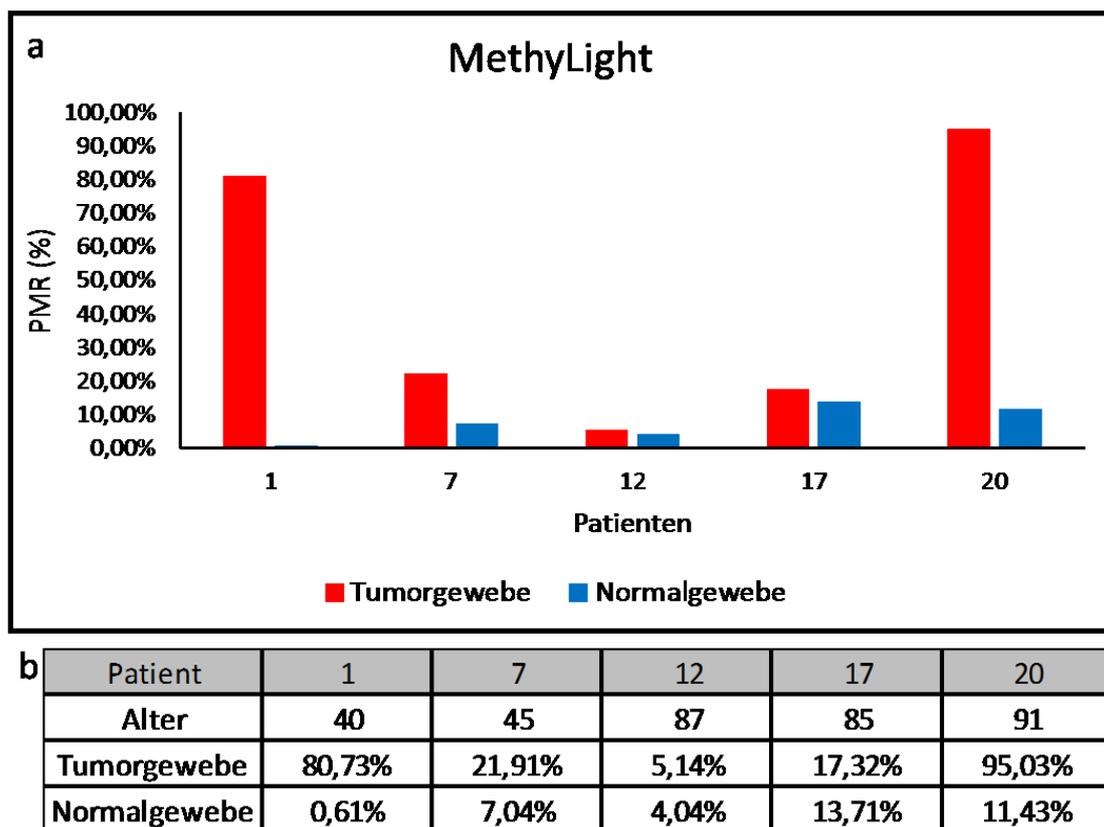


Abbildung 8: Die MethyLight-Analyse zeigt eine erhöhte Methylierungsrate im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zu Normalgewebe

Aus den Gewebeproben extrahierte DNA wurde einer Bisulfitkonvertierung unterzogen und darauffolgend in einer MethyLight-Analyse unter Verwendung *TUSC3*-spezifischer Primer eingesetzt, um die PMR (percentage of methylation ratio) zu ermitteln.

a) Graphische Darstellung des PMR der fünf untersuchten Patienten (rot: Tumorgewebe, blau: Normalgewebe).

b) Tabellarische Auflistung des Alters eines jeden Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme und der entsprechenden PMRs (n=1).

Alle analysierten Patientenproben zeigten im Tumorgewebe (rot) eine gesteigerte Methylierungsrate des TUSC3-Promotors im Vergleich zu entsprechendem Normalgewebe (blau). Insbesondere bei Patient 1 (Tumorgewebe: 80,73 %; Normalgewebe: 0,61 %) und Patient 20 (Tumorgewebe: 95,03 %; Normalgewebe: 11,43 %) war eine deutliche Divergenz hinsichtlich der Methylierungsrate zwischen den beiden Geweben erkennbar. Die restlichen Patientenproben zeigten eine weniger starke Diskrepanz der Methylierungsrate zwischen Tumor- und Normalgewebe. Tendenziell war jedoch auch bei diesen Proben eine leicht erhöhte Methylierung in den Tumorgeweben zu erkennen. Somit wurde in diesem Versuch ein erster Hinweis gewonnen, dass es zu einem Anstieg der Methylierungsrate des TUSC3-Promotors im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom kommt, was die Rolle von TUSC3 als Tumorsuppressor untermauern würde. Eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Methylierungsrate des TUSC3-Promotors konnte indes nicht beobachtet werden.

3.2. Validierung der Ergebnisse der MethyLight-Analyse mittels „Next Generation Sequencing“

Zur Validierung des Resultates der MethyLight-Analyse wurde eine „Next Generation Sequencing“-Analyse (NGS) durchgeführt. Genutzt wurden hierfür erneut Gewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom (Normal-/Tumorgewebe). Es wurden sowohl einige zuvor verwendete Proben (7, 17, 20) als auch neue Gewebeproben eingesetzt.

Mittels NGS wurde die Methylierung von 35 einzelnen CpGs (Cytosin-Guanin-Dinukleotiden) in den jeweiligen Proben bestimmt und anschließend ein Mittelwert für das jeweilige Gewebe jedes Patienten errechnet. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Abbildung 9 zu entnehmen.

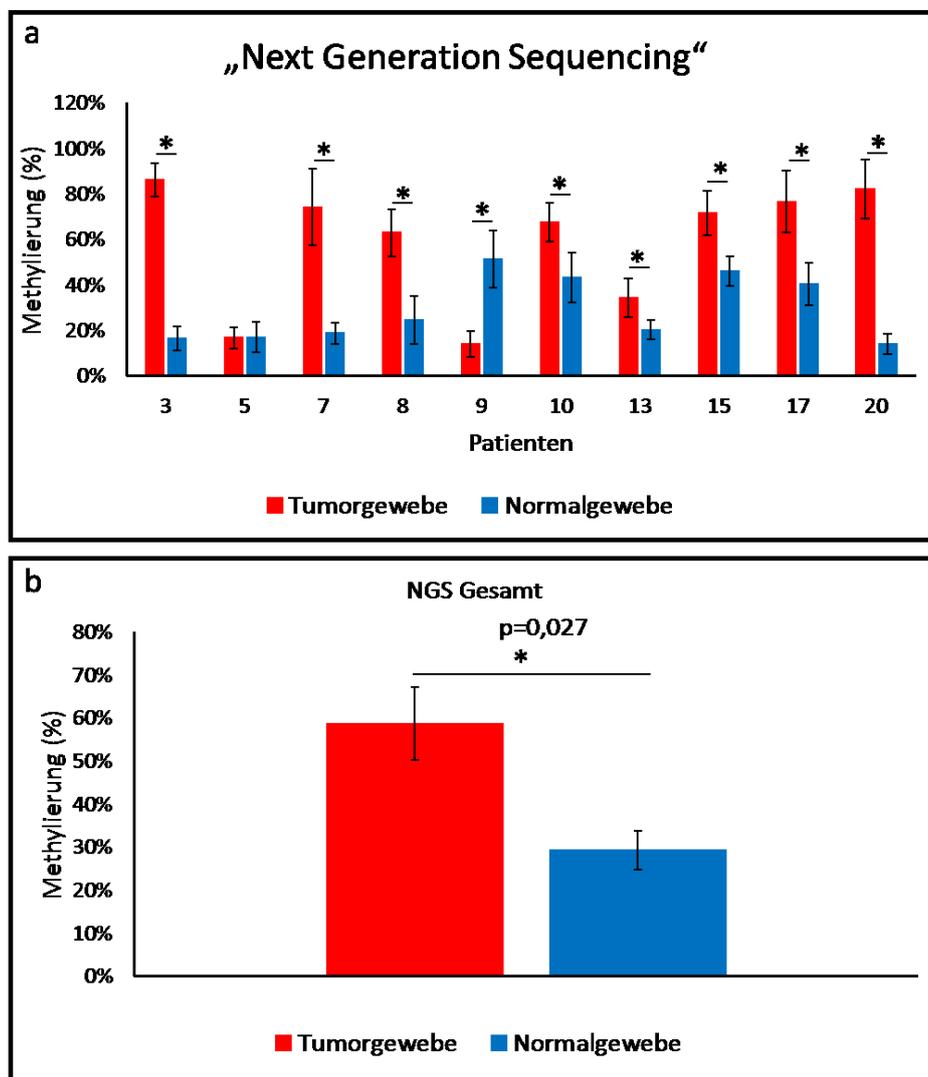


Abbildung 9: Nachweis einer erhöhten Methylierungsrate mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS)

„Next Generation Sequencing“-Analyse von humanen Gewebeproben. Normal- und Tumorgewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden für eine NGS-Analyse unter Verwendung spezifischer TUSC3-Primer genutzt.

a) Methylierungsrate der zehn analysierten Patienten (6 x jung/ 4 x alt). rot: Tumorgewebe (T); blau: Normalgewebe (N); (n=35; *p<0,05 T gegen N, Mann-Whitney-U Test).

b) Mittelwert der Tumorgewebeproben (rot) und der Normalgewebeproben (blau) aller zehn Patienten (n=10; *p<0,05 T gegen N; Mann-Whitney-U Test).

Tabelle 18: Übersichtstabelle zur Graphik aus Abbildung 9a

Methylierungswerte und Standardabweichung (SEM, Standard Error of the Mean) der einzelnen Patientenproben.

Jung	Alter	Tumorgewebe	SEM	Normalgewebe	SEM
3	35	86 %	7 %	16 %	5 %
5	40	17 %	5 %	17 %	7 %
7	45	74 %	17 %	19 %	5 %
8	47	63 %	10 %	25 %	10 %
9	41	14 %	6 %	51 %	13 %
10	44	68 %	9 %	43 %	11 %
Alt	Alter	Tumorgewebe	SEM	Normalgewebe	SEM
13	91	34 %	9 %	20 %	4 %
15	86	72 %	10 %	46 %	7 %
17	85	77 %	14 %	40 %	9 %
20	91	82 %	13 %	14 %	4 %

Abbildung 9a zeigt eine signifikant erhöhte Methylierungsrate im Tumorgewebe bei acht von zehn Patienten im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe. Lediglich Patient 5 wies keine erhöhte Methylierung im Tumorgewebe auf, Patient 9 hingegen zeigte eine erhöhte Methylierungsrate im Normalgewebe (Tumorgewebe: 14 %; Normalgewebe: 51 %). Eine Auftragung der Mittelwerte von Tumor- und Normalgewebe aller Patientenproben ergab eine etwa doppelt so starke Methylierung im Tumorgewebe (59 %) im Vergleich zu Normalgewebe (29 %) (9b). In Tabelle 18 sind die einzelnen Werte aus Abbildung 9a tabellarisch dargestellt.

Die NGS-Analyse ergab für die Patienten 7, 17 und 20 ein zur MethyLight-Analyse analoges Ergebnis, wenngleich die NGS-Analyse sensitiver zu sein scheint. Bei der Betrachtung des Alters der Patienten war auch hier keine Altersabhängigkeit festzustellen (Tumorgewebe jung: 53,6 % ± 9 %; Tumorgewebe alt: 66,25 % ± 11,5 % / Normalgewebe jung: 29 % ± 8,5 %; Normalgewebe alt: 30 % ± 6 %). Somit konnte das Ergebnis des vorangegangenen MethyLight-Versuchs mit Hilfe des „Next Generation Sequencing“ bestätigt werden, dass im Tumorgewebe von KRK-Patienten unabhängig vom Alter in den meisten Fällen eine TUSC3-Hypermethylierung nachzuweisen ist.

3.3. Verlust der TUSC3-Proteinexpression im kolorektalen Karzinomgewebe

Die Hinweise aus der MethyLight-Analyse und der „Next Generation Sequencing“-Analyse (NGS), dass *TUSC3* in Tumorgewebe des kolorektalen Karzinoms durch Hypermethylierung epigenetisch abgeschaltet wird, sollten im weiteren Verlauf dieser Dissertation durch eine Analyse der TUSC3-Proteinexpression verifiziert werden. Bereits vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass das TUSC3-Protein in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch beim Ovarialkarzinom, nicht mehr

exprimiert wird (Kratochvílová et al., 2015). Dies galt es in der vorliegenden Arbeit für das kolorektale Karzinom zu analysieren. Hierzu wurde eine Resektion von kolorektalem Tumor- als auch Normalgewebe von 20 Patienten vorgenommen. Anschließend wurden hieraus Proteine extrahiert und diese in einer „Western Blot“-Analyse unter Verwendung eines TUSC3-spezifischen Antikörpers eingesetzt. Dazu wurden die Proteinmengen der einzelnen Proben bestimmt und von jeder Probe 20 µg eingesetzt. Die durchgeführte Kontrolle mit Ponceau S zeigte, dass die Übertragung der Proteine aller Proben auf die Membran erfolgreich war. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ, mit welchem die Bandenstärke ermittelt und somit eine Aussage über den TUSC3-Proteingehalt der einzelnen Proben getroffen werden konnte. Abbildung 10 zeigt die Expression von TUSC3 (39 kDa) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im „Western Blot“.

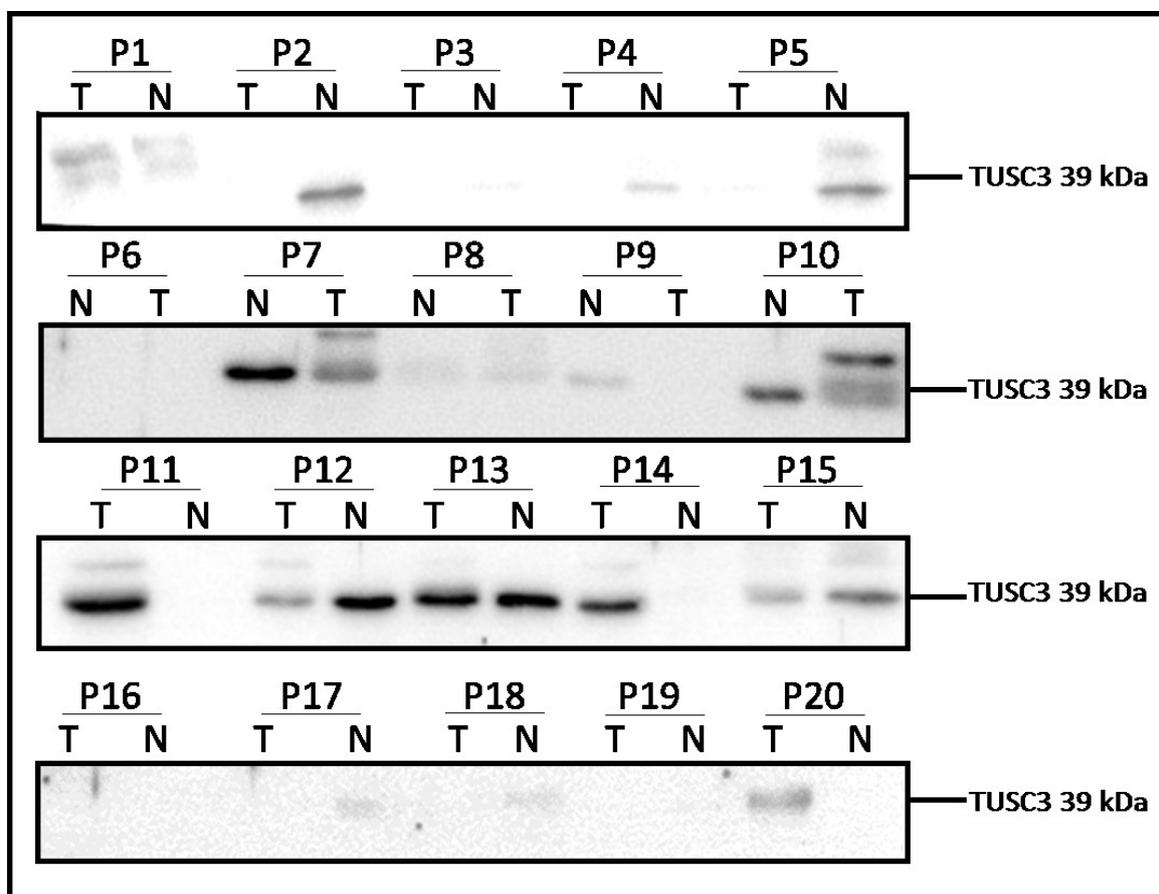


Abbildung 10: Analyse der TUSC3-Expression in humanem kolorektalen Tumor- und Normalgewebe

Aus Tumor- (T) und Normalgewebe (N) von 20 Patienten (P1-P20) mit kolorektalem Karzinom wurden Proteine extrahiert und in einer „Western Blot“-Analyse unter Verwendung eines TUSC3-spezifischen Antikörpers (39 kDa) eingesetzt (20µg pro Probe).

Die „Western Blot“-Analyse in Abbildung 10 zeigte für 14 der 20 Patienten mit kolorektalem Karzinom eine geringere TUSC3-Proteinexpression im Tumorgewebe als im entsprechenden Normalgewebe. Bei einigen Patienten konnte kein TUSC3-Protein im Tumorgewebe nachgewiesen werden (P2, P3, P4, P5, P9, P17, P18, P19). Dahingegen war das Ergebnis bei vier Patienten gegensätzlich. In den Tumorgeweben der Patienten P1, P11, P14 und P20 war die Expression des TUSC3-Proteins höher als

in ihren Normalgeweben. Bei Patient 6 und 16 konnte in keinem der analysierten Gewebe TUSC3-Protein detektiert werden. Die „Western Blot“-Analyse demonstriert somit, dass in 70 % der untersuchten Fälle die Expression des endogenen TUSC3-Proteins (in Isoform 1 und 2 von ca. 39 kDa) im Tumorgewebe - bis hin zu einem vollständigen Verlust des TUSC3-Proteins - verringert ist.

3.4. Analyse des Einflusses von TUSC3 auf Gene nachgeschalteter Signalwege

Im weiteren Verlauf der Dissertation wurden die zellulären Regulationsprozesse, an denen TUSC3 beteiligt ist, sowie dessen Funktion in Verbindung mit dem EGFR genauer untersucht. Zur Analyse der biologischen Prozesse, die durch TUSC3 reguliert werden, und der Gene, die daran beteiligt sind, wurde eine „Microarray“-Analyse vorgenommen. Hierzu wurden Triplikate von SW480-Zellen verwendet, die entweder mit einer Leervektor-Kontrolle (EV) oder einem TUSC3-Plasmid transfiziert waren. Nach RNA-Extraktion und reverser Transkription in cDNA wurde eine PCR mit spezifischen TUSC3-Primern durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Produkte der PCR nach Anfärbung mittels Ethidiumbromid im Agarosegel.



Abbildung 11: Agarosegel der für die „Microarray“-Analyse verwendeten cDNA-Proben
SW480-Zellen wurden mit einem Leervektor (EV) bzw. einem TUSC3-Plasmid transfiziert. Nach RNA-Extraktion und reverser Transkription in cDNA wurde eine PCR mit *TUSC3*-spezifischen Primern durchgeführt. Die Proben wurden nachfolgend auf ein Agarosegel aufgetragen (n=3).

Abbildung 11 zeigt eine erfolgreiche Überexpression von TUSC3 in den mit TUSC3 transfizierten Zellen. Ebenfalls ist eine schwache Bande für TUSC3 in den mit Leervektor transfizierten SW480-Zellen zu beobachten, die eine Detektion von endogenem TUSC3 zeigt. Die cDNAs der mit TUSC3 transfizierten Zellen wurden für den „Microarray“ eingesetzt.

Die statistische Auswertung des „Microarrays“ (in Kooperation mit Dr. Carsten Sticht, ZMF, UMM) deutet auf eine essentielle Rolle des TUSC3-Proteins bei verschiedenen biologischen Prozessen in der Zelle hin. So scheint TUSC3 an der N-Glykosylierung, dem Medikamentenstoffwechsel und der Proteinfaltung am ER beteiligt zu sein, da bei diesen Prozessen besonders viele Gene durch TUSC3 beeinflusst wurden. Des Weiteren wurden durch den „Microarray“ erste Hinweise gewonnen, welche

Gene bei der Prozessierung der Proteine am ER beteiligt sind und durch TUSC3 reguliert werden könnten (Abbildung 12).

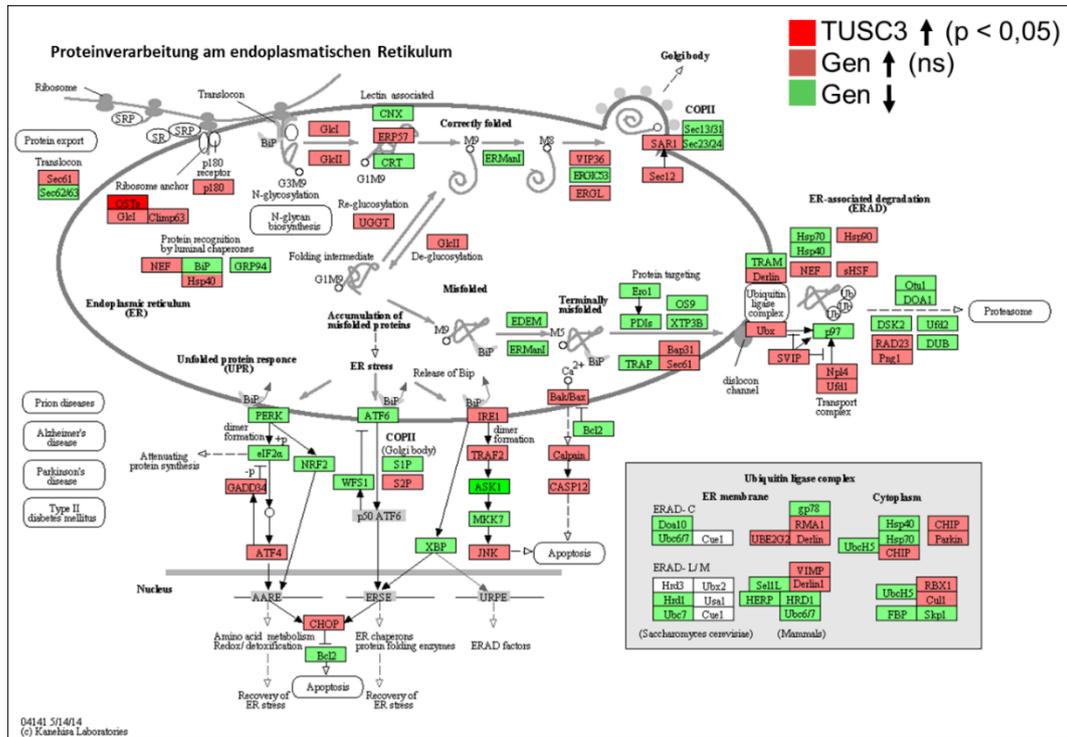


Abbildung 12: Proteinprozessierung am endoplasmatischen Retikulum

Überblick über die Gene, die an der Proteinprozessierung am ER beteiligt sind und durch TUSC3 hoch- (rot) oder herunterreguliert (grün) werden, anhand unsere „Microarray“-Analyse.

Bei näherer Analyse der statistischen Auswertung des „Microarray“ zeigte sich, dass für keines der an der Proteinprozessierung beteiligten Gene eine signifikante Regulation durch TUSC3 vorlag. Der für die Signifikanz festgelegte Schwellenwert wurde weder nach oben noch nach unten von einem der Gene überschritten. Dennoch wurden die Gene, auf deren Expression TUSC3 den größten Effekt hatte, *MGAT3*, *MGAT1*, *BAK1* und *BCL2*, Gene, die an der N-Glykosylierung oder der Apoptose beteiligt sind, genauer untersucht. Hierzu wurden Echtzeit-PCRs (RT-qPCR) unter der Verwendung spezifischer Primer für diese Gene durchgeführt. Als Kontrolle dienten Primer gegen das $\beta 2M$ -Gen. Die Auswertung dieser PCRs (n=3) ist in Abbildung 13 graphische dargestellt.

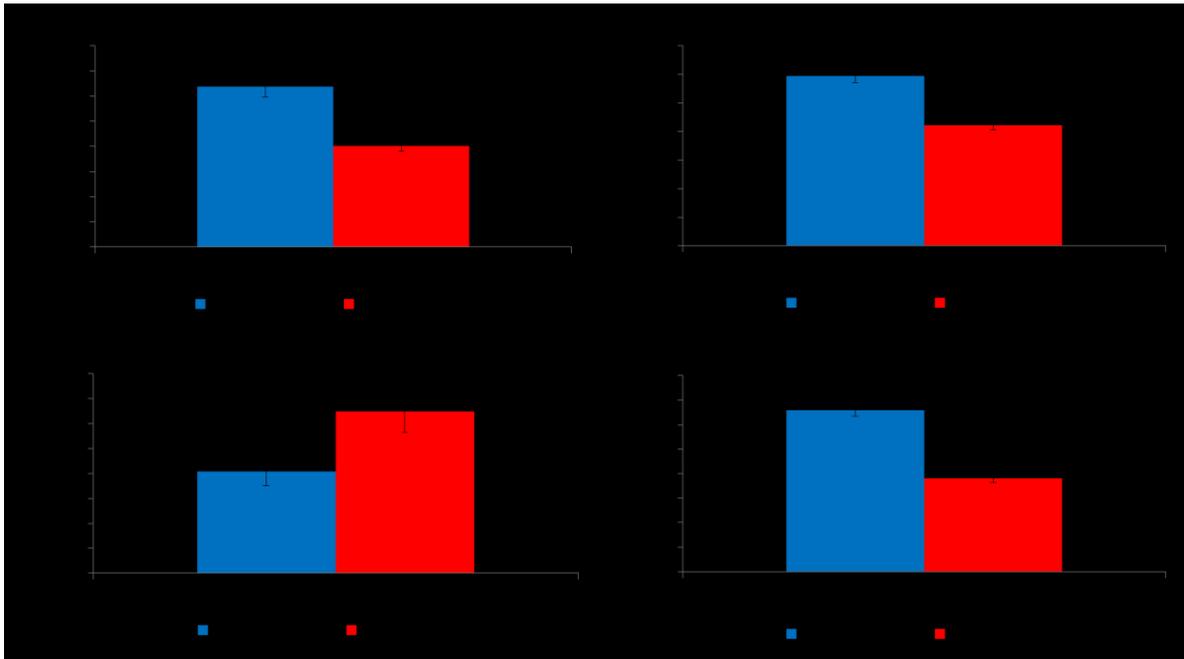


Abbildung 13: Graphische Auswertung der RT-qPCR-Analyse der besten Kandidatengene des „Microarrays“

Die Gene, die im „Microarray“ die stärkste Regulierung durch TUSC3 zeigten, wurden einer RT-qPCR-Analyse unterzogen, um den Effekt von TUSC3 auf diese Gene näher zu untersuchen.

a-d) Graphische Darstellung der RT-qPCRs der durch TUSC3 beeinflussten Gene. Es wurden jeweils spezifische Primer für **a) *MGAT3***, **b) *MGAT1***, **c) *BAK1*** und **d) *BCL2*** verwendet. Für jedes untersuchte Gen wurde die „n-fache Induktion“ der Leervektor- (EV) Proben (blau) und der mit TUSC3-Plasmid transfizierten Proben (rot) gegeneinander aufgetragen. (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3, T-Test, Mann-Whitney-U = nicht signifikant [ns]).

Die statistische Auswertung zeigt, dass das *MGAT3*-Gen in den mit TUSC3 transfizierten Zellen (0,8-fache Induktion) im Vergleich zu den Leervektorzellen (1,28-fache Induktion; *p=0,0009) signifikant herunterreguliert wurde. Gleiches konnte auch für *MGAT1* (EV: 1,19; TUSC3: 0,84; *p=0,0004) und *BCL2* (EV: 1,32; TUSC3: 0,76; *p<0,0001) festgestellt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in den mit TUSC3 transfizierten Zellen *BAK1* signifikant hochreguliert wurde (EV: 0,82; TUSC3: 1,29; *p=0,015).

3.5. Inhibition der EGFR-Phosphorylierung durch TUSC3

Eine Aktivierung des EGFR erfolgt durch extrazelluläre Ligandenbindung, deren Signal er über Autophosphorylierung und die Rekrutierung von Signalmolekülen wie Akt/PKB, MEK oder STAT-Protein ins Zellinnere leitet. Über diese Signaltransduktion wird das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindert. Daher wurde im nachfolgenden Versuchsteil die Wirkung von TUSC3 auf die Phosphorylierung des EGFR untersucht. Zur näheren Charakterisierung des Effekts von TUSC3 auf den EGF-Rezeptor wurden SW480-Zellen mit einem Leervektor (EV) oder einem TUSC3-Plasmid transfiziert und nach einer 48-stündigen Transfektion wurde den Zellen für 16 h das Nährmedium entzogen („Hungern“). Es folgte eine Stimulation für 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min mit

20 % FBS („Serum Schock“). Dies diente dazu, eine schnelle Internalisierung, eine endosomale Sortierung, ein Recycling oder den lysosomalen Abbau des EGFR auszulösen. Anschließend wurden Proteine für eine „Western Blot“-Analyse isoliert. Zur Detektion wurden zum einen ein Antikörper, welcher spezifisch gegen die intrazelluläre C-terminale Domäne des EGFR gerichtet ist, und zum anderen ein Transferrinrezeptor-spezifischer Antikörper (CD71) eingesetzt. Der Transferrinrezeptor ist ein für Transport und Aufnahme Transferrin-gebundener Eisenionen verantwortliches Transmembranprotein. Wie EGFR veranlasst auch dieses eine rezeptorvermittelte Endozytose über Clathrin-beschichtete Einstülpungen der Plasmamembran („clathrin-coated pits“).

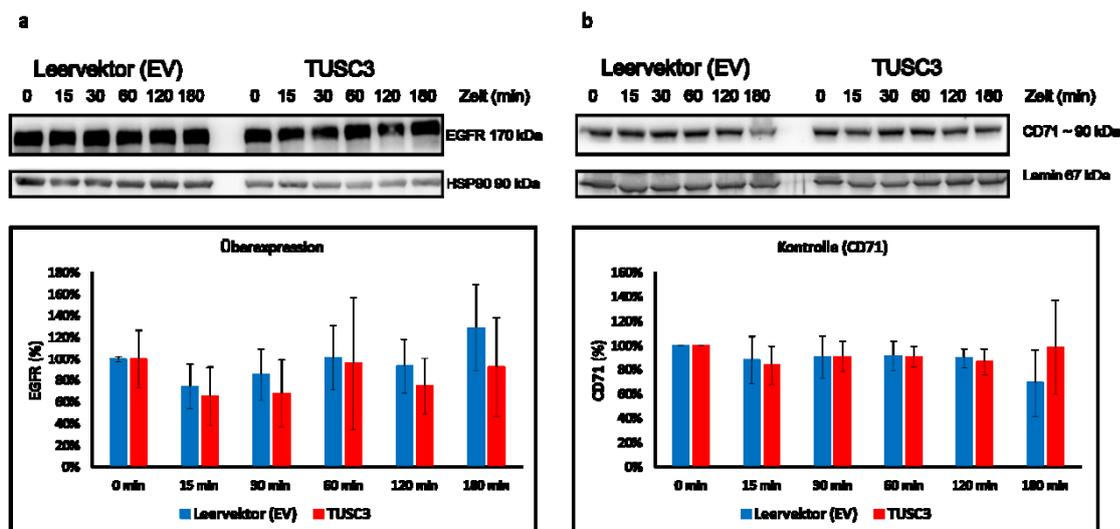


Abbildung 14: Einfluss von TUSC3 auf die Expression des EGFR im Gesamtzelllysat

SW480-Zellen wurden mit Leervektor bzw. TUSC3-Plasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ihnen das Nährmedium entzogen, bevor sie in einer Zeitkinetik (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) mit 20 % FBS stimuliert wurden. Die isolierten Proteine dienten der Analyse im „Western Blot“ mittels a) EGFR-spezifischem Antikörper (C-Terminus, 170 kDa) bzw. b) Transferrinrezeptor-spezifischem Antikörper (CD71, 90 kDa). Als Abgleich diente HSP90 (90 kDa) für a) bzw. Lamin (67 kDa) für b) (n=3; blau: Leervektor [EV]; rot: TUSC3).

Die „Western Blot“-Analyse der Proben aus Abbildung 14 ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied, weder in der Expression des unphosphorylierten EGFR, noch in der Expression des Transferrinrezeptors, zwischen Zellen, die mit leerem Plasmid transfiziert wurden und TUSC3-überexprimierenden Zellen. Dies legt nahe, dass TUSC3 nicht den Abbau des EGFR begünstigt.

Daraufhin wurde die Expression des phosphorylierten EGFR (pEGFR [Y1068], cell signaling) im „Western Blot“ unter Verwendung der gleichen Proteinproben analysiert. Zusätzlich zur TUSC3-Überexpression wurde als Kontrolle ein „Knockdown“ des Proteins durch Transfektion entsprechender siRNA erzielt (Abbildung 15).

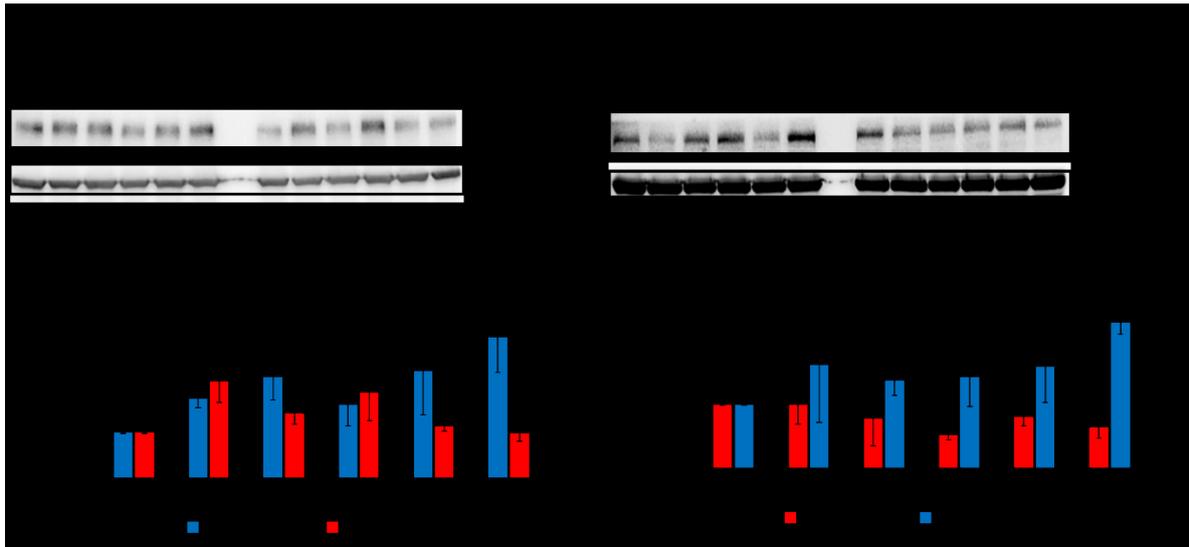


Abbildung 15: Einfluss von TUSC3 auf die Expression des phosphorylierten EGFR im Gesamtzelllysate

Kolorektale Krebszellen wurden für 48 h transfiziert, bevor ihnen für 16 h das Nährmedium entzogen wurde und sie nachfolgend mit 20 % FBS in einer Zeitkinetik (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) stimuliert wurden. Die extrahierten Proteine wurden bei einer „Western Blot“-Analyse verwendet. Zur Detektion wurde ein p-EGFR-Antikörper (170 kDa), zur Kontrolle HSP90 (90 kDa) eingesetzt. **a)** SW480-Zellen wurden mit leerem Vektor (EV) bzw. TUSC3-Plasmid transfiziert (n=4; *p<0,05 EV gegen TUSC3, „Two-Way“ ANOVA). **b)** HCT116-Zellen wurden mit 100 nM siTUSC3 bzw. einer Kontroll-siRNA für 72 h transfiziert (n=3; *p<0,05 Kontroll siRNA gegen siTUSC3, „Two-Way“ ANOVA).

Die statistische Auswertung (Abbildung 15a) zeigte eine signifikante Abnahme der pEGFR-Expression nach 180 min Stimulation mit 20 % FBS in den TUSC3-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden (EV: $3,1 \pm 0,6$; TUSC3: $1,0 \pm 0,2$; *p=0,015). Durch einen TUSC3-„Knockdown“ konnte dieses Ergebnis validiert werden (Abbildung 15b). Ein „Knockdown“ von TUSC3 resultierte in einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung des EGFR nach 180 min Stimulation in den Zellen (siTUSC3: $2,3 \pm 0,2$; Kontroll-siRNA: $0,6 \pm 0,2$; *p=0,029). Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass TUSC3 die Phosphorylierung des EGFR an dem C-terminalen Tyrosinrest Y1068 vermindert, welcher für die Rezeptordimerisierung und die Initiierung der stromabwärtigen Signalisierung verantwortlich ist (Abe et al., 2006).

3.6. Beeinflussung des EGFR-Aufkommens in einzelnen Zellkompartimenten durch TUSC3

Nach Analyse des Einflusses von TUSC3 auf den phosphorylierten bzw. unphosphorylierten EGFR im Gesamtzelllysate wurde im nachfolgenden Versuch untersucht, ob TUSC3 die subzelluläre Verteilung des EGFR verändert. Anlass dazu gaben die Untersuchungsergebnisse von Wang, Wang, Yamaguchi, Lee und Hung. (2010). Wang et al. (2010) zeigten, dass TUSC3 in gesunden Zellen an der Zellmembran lokalisiert ist und in Tumorzellen darüber hinaus auch in den Nucleus transportiert wird. Im Zellkern interagiert n-EGFR mit Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie und wirkt als transkriptioneller Co-Aktivatoren für diverse Onkogene (Lo et al., 2005/1). Dies resultiert in Therapieresistenzen, Proliferation und Überleben der Karzinomzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb SW480-Zellen mit einem Leervektor bzw. TUSC3-Plasmid transfiziert. Nach 48 h wurde den Zellen für 16 h das Nährmedium entzogen. Nachfolgend wurden die Zellen in einer Zeitkinetik (0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min) einer Stimulation mit 20 % FBS unterzogen. Es folgte eine subzelluläre Fraktionierung, in der die Zellen in die einzelnen Zellkompartimente, wie Zytosol, nukleäre Bestandteile sowie unlösliche Bestandteile (Matrix, Zytoskelettproteine, Kernmembranen, DNA, ER), aufgetrennt wurden. In der anschließenden „Western-Blot“-Analyse wurden die Expressionen des EGF-Rezeptors, des phosphorylierten EGF-Rezeptors sowie, als Kontrolle, des Transferrinrezeptors evaluiert (Abbildung 16).

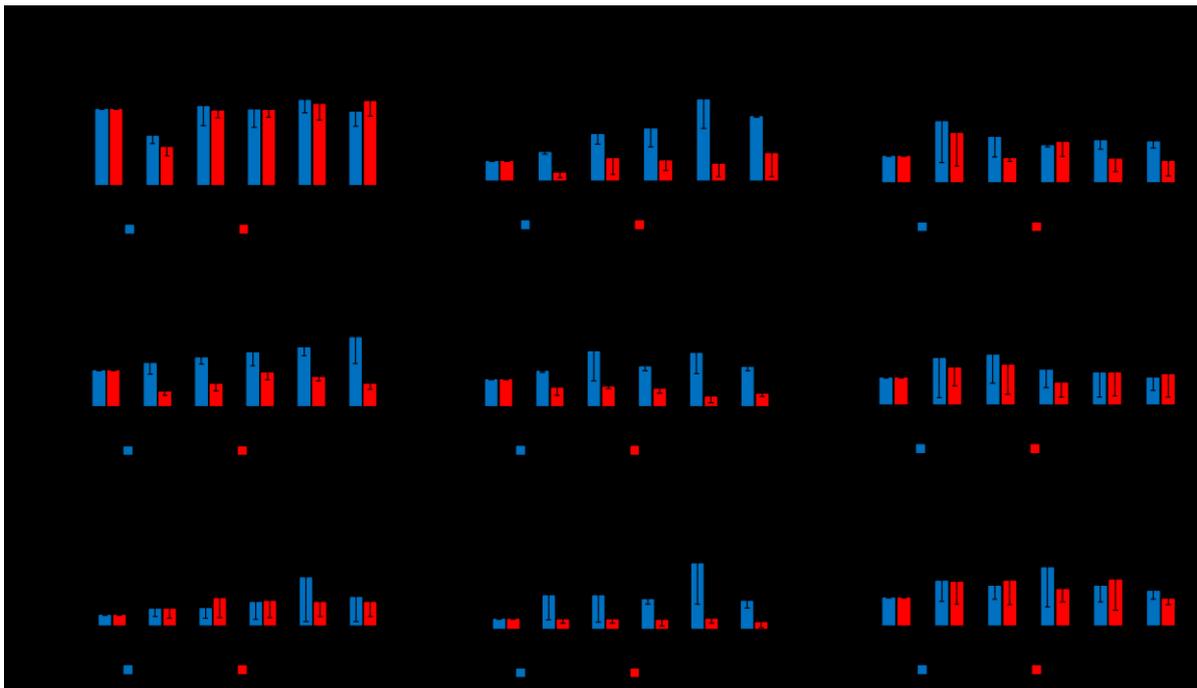


Abbildung 16: Einfluss von TUSC3 auf die Expression von EGFR bzw. p-EGFR in subzellulären Fraktionen

SW480-Zellen wurden mit Leervektor (EV, blau) bzw. TUSC3 (rot) für 48 h transfiziert, bevor ihnen für 16 h das Nährmedium entzogen und sie nachfolgend mit 20 % FBS in einer Zeitkinetik (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) stimuliert wurden. Die Zellbestandteile wurden mittels einer subzellulären Fraktionierung aufgetrennt (Zytosol/Kern/unlösliche Fraktion) und die Fraktionen in einer „Western Blot“-Analyse eingesetzt. **Links:** Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die Expression von EGFR in den subzellulären Fraktionen (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3; „two-way“ ANOVA).

Mitte: Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die Expression von p-EGFR in den subzellulären Fraktionen. Lamin bzw. Aktin dienen für die Kern- bzw. Zytosolfraktion als Abgleich (n=2; *p<0,05 EV gegen TUSC3; „Two-Way“ ANOVA [Kernfraktion T-Test]).

Rechts: Analyse der Zellfraktionen unter Verwendung des Transferrinrezeptor-Antikörpers (CD71) zur Kontrolle. Lamin diente als Abgleich für Zytosol- und Kernfraktion (n=2).

Im Vergleich zu Zellen, welche mit leerem Vektor transfiziert wurden, führte TUSC3 nach 180 min Stimulation in der Kernfraktion zu einer signifikant verringerten Expression des EGFR (Abbildung 16; EV: $1,9 \pm 0,7$; TUSC3: $0,6 \pm 0,1$; *p=0,019). Des Weiteren konnte in allen Zellkompartimenten eine durch TUSC3 verringerte EGFR-Phosphorylierung festgestellt werden. Diese manifestierte sich sowohl in der Zytosolfraktion nach 120 min (*p=0,036), als auch in der Kernfraktion nach 60 min (*p=0,025) bzw. 180 min (*p=0,048). Darüber hinaus hatte TUSC3 in keiner der untersuchten Fraktionen einen statistisch eindeutigen Effekt auf die Expression des Transferrinrezeptors. Es zeigte sich, dass TUSC3 ausschließlich die Akkumulation von EGFR im Zellkern verhindert, nicht aber die des

Transferrinrezeptors, wodurch der zuvor erwähnte negative Einfluss von n-EGFR auf die Krebsentwicklung unterbunden wird.

3.7. Keinen Effekt durch TUSC3 auf die Expression des EGFR an der Zelloberfläche

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen auf die intrazelluläre C-terminale Domäne des EGFR eingegangen wurde, galt es in diesem Teil der Arbeit die N-terminale Domäne des EGFR an der Zelloberfläche näher zu untersuchen. Hierzu wurden SW480- und LOVO-Zellen mit einem leeren Plasmid bzw. TUSC3-Plasmid für 48 h transfiziert. Nach 48 h wurde den Zellen für 16 h das Nährmedium entzogen und die Hälfte der Zellen wurde 30 min mit 20 % FBS stimuliert. Darauf folgte eine FACS-Analyse mittels EGFR-FITC-Antikörper bzw. mit dem Transferrinrezeptor-Antikörper (CD71) als Kontrolle.

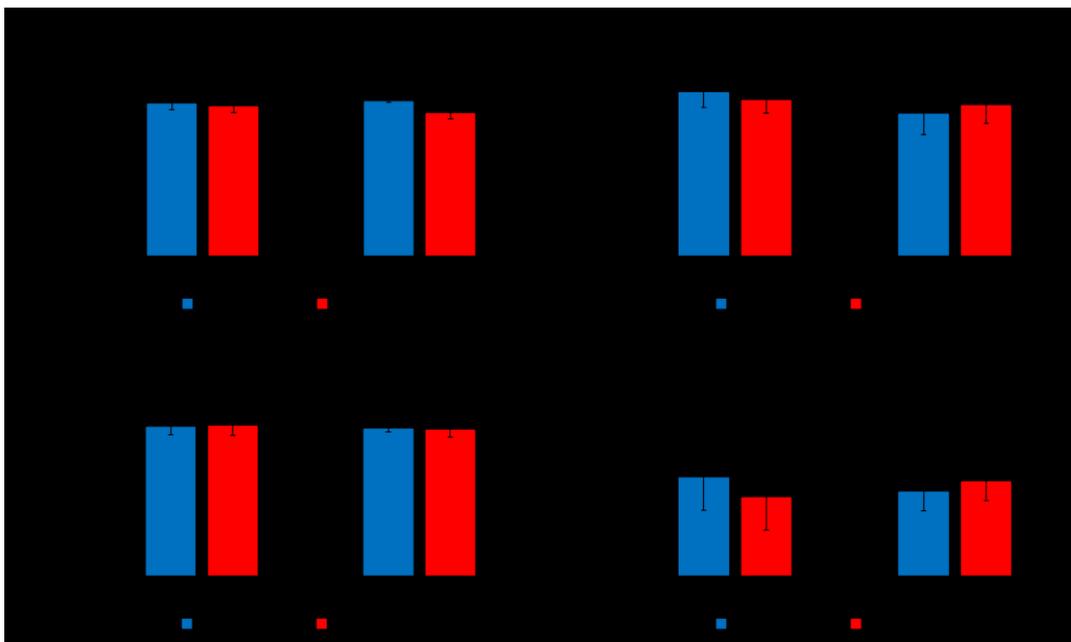


Abbildung 17: FACS-Analyse zur Ermittlung des Einflusses von TUSC3 auf die N-terminale Domäne des EGFR

KRK-Zellen wurden mit Leervektor (EV, blau) bzw. TUSC3-Plasmid (rot) für 48 h transfiziert. Nach 16-stündigem Entzug des Nährmediums wurde ein Teil der Zellen für 30 min mit 20 % FBS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einer FACS-Analyse mittels EGFR-FITC-Antikörper (n=3) bzw. CD71-Antikörper (n=4) als Kontrolle unterzogen. **a+b**): FACS-Analyse in SW480-Zellen. a) mit EGFR-FITC-Antikörper b) mit CD71-Antikörper **c+d**): FACS-Analyse in LOVO-Zellen. c) mit EGFR-FITC-Antikörper d) mit CD71-Antikörper.

Die quantitative Auswertung der FACS-Analyse (Abbildung 17) zeigte, dass TUSC3 sowohl in SW480- als auch in LOVO-Zellen keinen relevanten Effekt auf die N-terminale Domäne des EGFR hat. Sowohl in den „Leervektor“-Zellen als auch in den Zellen, die mit TUSC3 transfiziert wurden, war eine Expression des EGFR von 90 % detektierbar. Auch eine Stimulation mit 20 % FBS zeigte keinen Effekt auf die EGFR-Expression. Ein analoges Resultat konnte in der FACS-Analyse für die Transferrinrezeptor-Expression

(CD71) erhalten werden. Somit wird davon ausgegangen, dass TUSC3 keinen Effekt auf die Expression der N-terminalen Domäne des EGFR hat.

3.8. Inhibierung der durch AKT und ERK1/2 vermittelten Signaltransduktion mittels TUSC3

Aufgrund der Erkenntnis, dass TUSC3 einen Einfluss auf p-EGFR besitzt, stellte sich die nächste Frage, ob TUSC3 auch einen Einfluss auf die Signalweiterleitung stromabwärts des EGF-Rezeptors hat. Um dies näher zu beleuchten, wurde der Fokus auf den Effekt von TUSC3 auf den RAS/RAF/ERK- (Proliferation) und den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Überleben) gerichtet. Es wurden verschiedene Kolonkarzinomzellen (SW480, HCT116) sowie eine nicht maligne Zelllinie (HEK293T) mit TUSC3 bzw. einem leeren Vektor für 48 h transfiziert, gefolgt von einem 16-stündigen Nährmediumentzug und einer Restimulierung mit 20 % FBS für 0 min, 5 min, 15 min und 30 min. Zur Kontrolle diente erneut ein „Knockdown“ mit TUSC3-siRNA. Die extrahierten Proteine wurden in einer „Western Blot“-Analyse unter Verwendung eines p-AKT-spezifischen (64 kDa, Cell Signaling) bzw. eines p-ERK1/2-spezifischen Antikörpers (42 kDa, Santa Cruz) eingesetzt. Zur Normalisierung diente die Expression von general-ERK2 (42 kDa, Santa Cruz).

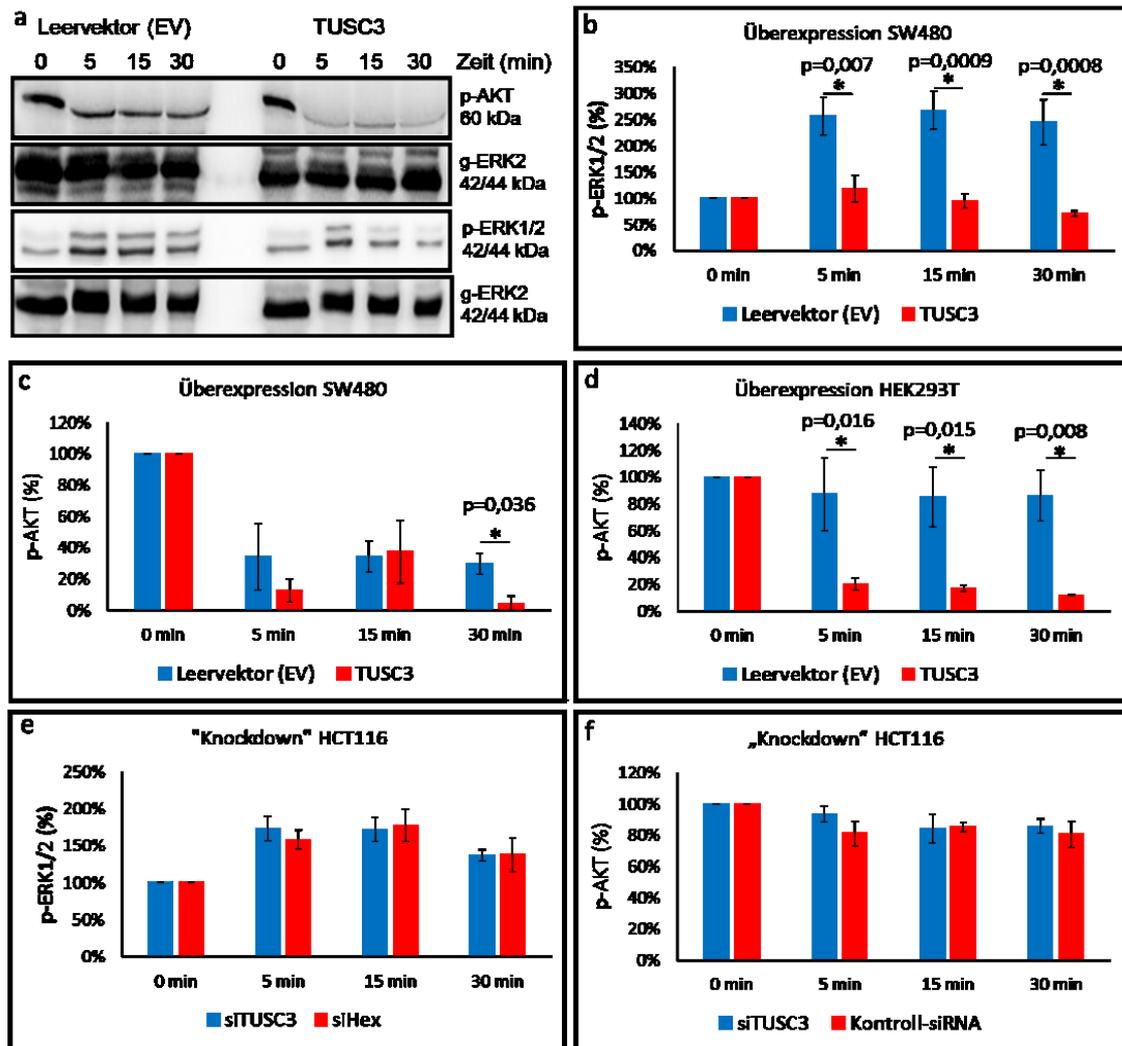


Abbildung 18: Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die nachgeschalteten AKT/ERK1/2-Signalwege

Die Zellen (SW480, HEK293T) wurden mit einem leeren Vektor (EV, blau) bzw. TUSC3-Plasmid (rot) für 72 h transfiziert, bevor ihnen für 16 h das Nährmedium entzogen wurde. Anschließend wurden die Zellen in einer Kurzzeitkinetik für 0 min, 5 min, 15 min und 30 min mit 20 % FBS stimuliert. Die extrahierten Proteine wurden in einer „Western Blot“-Analyse unter Verwendung eines p-AKT- bzw. p-ERK1/2-spezifischen Antikörpers (60 kDa bzw. 42/44 kDa) eingesetzt. Als Kontrolle diente g-ERK2 (42/44 kDa).

a) Repräsentative „Western Blot“-Analyse von SW480 Zellen **b)** Analyse des Einflusses von TUSC3 auf den ERK1/2-Signalweg. Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse in SW480-Zellen mit ImageJ (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3; „Two-Way“ ANOVA). **c+d)** Analyse des Einflusses von TUSC3 auf den AKT-Signalweg. Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse in SW480-Zellen (c) (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3, T-Test) bzw. HEK293T-Zellen (d) (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3, „two-way“ ANOVA) mit ImageJ. **e+f)** Zusätzlich wurde analog ein TUSC3-„Knockdown“ (blau) in HCT116-Zellen durchgeführt und diese zur Kontrolle mit einer Kontroll-siRNA (rot) transfiziert. **e)** Analyse des Einflusses eines „Knockdowns“ von TUSC3 auf den ERK1/2-Signalweg. Quantitative Auswertung mit ImageJ (n=4). **f)** Analyse des Einflusses eines „Knockdowns“ von TUSC3 auf den AKT-Signalweg. Quantitative Auswertung mit ImageJ (n=4).

Die „Western Blot“-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von TUSC3 auf die ERK1/2-vermittelte Signaltransduktion zeigte nach 5-minütiger, 15-minütiger und 30-minütiger Stimulation eine signifikante Zunahme der p-ERK1/2-Expression in den Zellen (SW480), die nicht mit TUSC3 transfiziert wurden, wohingegen sich das p-ERK1/2-Level in den transfizierten Zellen nicht veränderte (EV: $2,6 \pm 0,4$; TUSC3: $1,0 \pm 0,1$; *p<0,07) (Abbildung 18b). Dieser Effekt konnte ebenso in HEK293T- als auch HCT116-Zellen beobachtet werden (Abbildung A1). Ein „Knockdown“ von TUSC3 in HCT116-Zellen

fürhte zu einer Aufhebung dieses Effektes (Abbildung 18e). Somit zeigte sich hier, dass TUSC3 eine schnelle Serum-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 verhinderte.

Die Analyse zur Ermittlung des Einflusses von TUSC3 auf die AKT-vermittelte Signaltransduktion zeigte eine signifikante Inhibition der p-AKT-Expression durch TUSC3 in HEK293T-Zellen (Abbildung 18d). Dieser Effekt konnte in SW480-Zellen nach 30-minütiger Stimulation mit 20 % FBS ebenfalls festgestellt werden (EV: $0,3 \pm 0,07$; TUSC3: $0,05 \pm 0,05$; * $p=0,036$) (Abbildung 18c). Auch hier führte ein TUSC3-„Knockdown“ in HCT116-Zellen zu einer Aufhebung des Effektes (Abbildung 18f).

Somit wird gefolgert, dass TUSC3 einen inhibitorischen Effekt sowohl auf die AKT- als auch auf die ERK1/2-vermittelte Signaltransduktion hat.

3.9. Inhibition der EGFR-Signaltransduktion durch TUSC3

Neben dem EGFR/AKT/ERK-Weg wurden noch andere Tumor-relevante Kaskaden untersucht, die mit dem EGFR-Weg in Wechselwirkung stehen. Dazu sollte in diesem Teil der Arbeit die Auswirkung von TUSC3 auf die Promotorelemente SRE (serum response element), HRE (hypoxia response element), PPRE (PPAR response element) und TopFlash (TCF4/beta-catenin)-Luciferase-gekoppelter Reporterplasmide eruiert werden. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit Leervektor bzw. TUSC3 und dem entsprechenden Reporterplasmid co-transfiziert. Die Proteine wurden 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion extrahiert und in einem Luciferase-Test eingesetzt, um zu prüfen, ob mit steigender Transfektionsdauer eine Veränderung der Promotoraktivität zu erkennen ist. Als Kontrolle diente ein „Knockdown“ von TUSC3 in HCT116-Zellen bei gleichzeitiger Co-Transfektion mit den Reporterplasmiden (Abbildung 19).

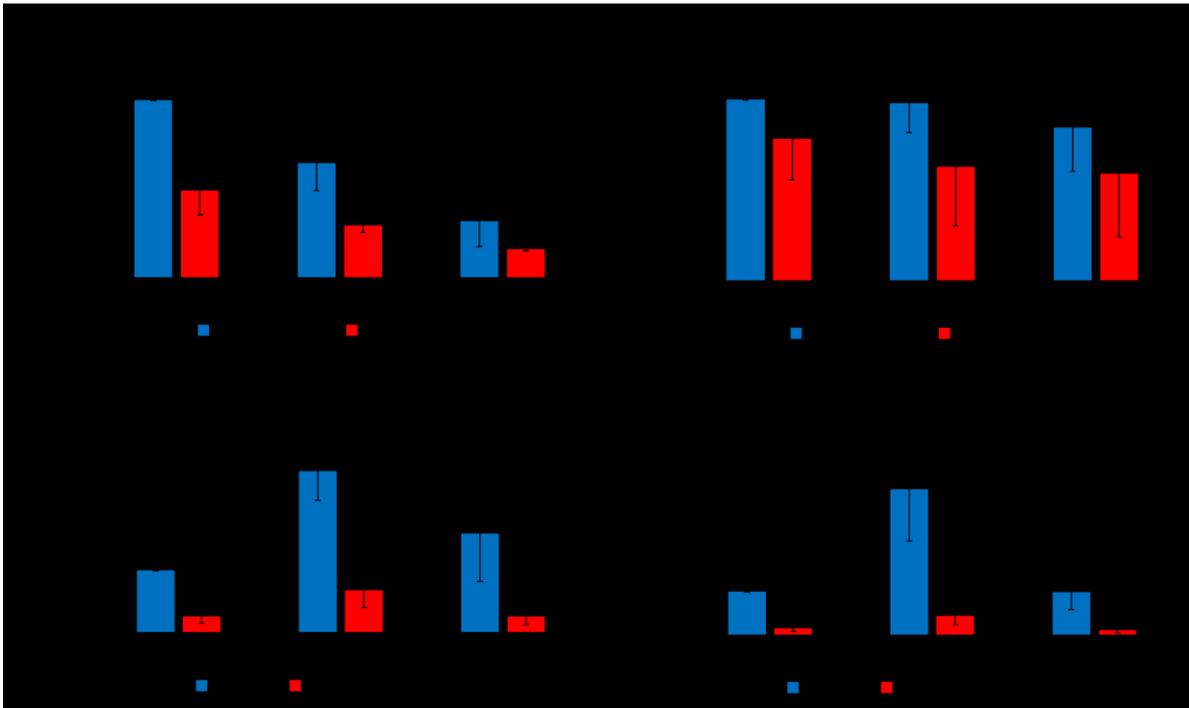


Abbildung 19: Luciferase-Test zur Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die EGFR-Signaltransduktion

a+b) HEK293T-Zellen wurden mit Leervektor (EV, blau) bzw. TUSC3 (rot) und entsprechendem Reporterplasmid co-transfiziert. Proteine wurden 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion für einen Luciferase-Test geerntet und die Luciferaseaktivität des entsprechenden Reporterplasmids gemessen (n=4; *p<0,05 EV gegen TUSC3, „Two-Way“ ANOVA). **a)** Luciferase-Test für das HRE-Reporterplasmid. **b)** Luciferase-Test für das TopFlash-Reporterplasmid. **c+d)** TUSC3-„Knockdown“ in HCT116-Zellen bzw. Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA. Die Zellen wurden mit HRE-Reporterplasmid **(c)** bzw. TopFlash-Reporterplasmid **(d)** co-transfiziert. Proteine wurden 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion für einen Luciferase-Test geerntet und es wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids gemessen (n=5; *p<0,05 Kontroll-siRNA gegen siTUSC3; „Two-Way“ ANOVA).

Der Luciferase-Test für das HRE-Reporterplasmid ergab eine eindeutig verringerte Luciferaseaktivität um 50 % im Fall einer TUSC3-Überexpression in HEK293T-Zellen 24 h nach Transfektion im Vergleich zu Zellen, welche mit Leervektor transfiziert wurden (*p=0,007) (Abbildung 19a). Ein TUSC3-„Knockdown“ in HCT116-Zellen und gleichzeitiger Co-Transfektion des HRE-Reporterplasmids resultierte im Vergleich zu einer Transfektion mit Kontroll-siRNA in einer signifikant stärkeren Luciferaseaktivität 48 h nach Transfektion (Abbildung 19c); was das Ergebnis aus Abbildung 19a bestätigt. Somit hemmt eine TUSC3-Überexpression signifikant die Hypoxie.

Der Luciferase-Test für das TopFlash-Reporterplasmid ergab eine schwächere, aber statistisch nicht signifikant unterschiedliche Luciferaseaktivität für eine TUSC3-Überexpression in HEK293T-Zellen (ca. 67 %) im Vergleich zu Zellen, welche mit leerem Vektor transfiziert wurden (ca. 94 %) (Abbildung 19b). Ein TUSC3-„Knockdown“ in HCT116-Zellen und simultaner Co-Transfektion des TopFlash-Reporterplasmids resultierte dagegen in einer signifikant verstärkten Luciferaseaktivität 48 h nach Transfektion im Vergleich zu Zellen, welche TUSC3 endogen exprimierten (siTUSC3: $3,4 \pm 1,2$; Kontroll-siRNA: $0,4 \pm 0,2$; *p=0,001) (Abbildung 19d). Der „Knockdown“ lässt den Schluss zu, dass auch eine Inhibierung des TopFlash-Promotorelements durch TUSC3 möglich sein könnte.

Auch bei der Untersuchung des PPRE zeigte sich im „Knockdown“ ein signifikanter Anstieg der Luciferaseaktivität des PPRE-Promotorelements in HCT116-Zellen, bei denen TUSC3 abgeschaltet wurde. Die Aktivität des SRE-Promotorelements wurde durch TUSC3 nicht verändert (Abbildung A2).

3.10. Inhibierung der durch Tunicamycin vermittelte Deglykosylierung des EGFR mittels TUSC3

Bei der N-Glykosylierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation. Hierbei werden Zuckerreste N-glykosidisch an den Asparaginrest naszierender Proteine angefügt. Die Synthese der Grundstruktur der N-Glykosylierung erfolgt am Dolicholpyrophosphat im ER. Das natürliche Antibiotikum Tunicamycin hemmt die Bildung des Oligosaccharid-Dolicholkomplexes und inhibiert somit den gesamten Prozess der N-Glykosylierung (Shrimal et al., 2015). Die N-Glykosylierung ist darüber hinaus für die korrekte Integration des EGFR in die Zellmembran verantwortlich. Da bei der N-Glykosylierung auch TUSC3 involviert ist, galt es den Einfluss von TUSC3 auf die N-Glykosylierung des EGFR zu untersuchen. Um diesen zu überprüfen, wurden SW480-Zellen mit einem Leervektor-Plasmid (EV) oder einem TUSC3-Plasmid transfiziert und zusätzlich mit Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt. Im „Western Blot“ zeigten sowohl die mit dem Leervektor transfizierten Zellen, als auch die mit TUSC3-transfizierten Zellen, die zusätzlich mit Tunicamycin behandelt wurden, zwei Banden für den EGFR-Rezeptor; eine bei 170 kDa und eine bei 130 kDa. Bei den nicht mit Tunicamycin behandelten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, und auch bei den Zellen, die mit TUSC3 transfiziert wurden, manifestierte sich nur eine Bande für den EGFR bei 170 kDa. Dies lässt vermuten, dass die Bande bei 170 kDa den glykosylierten EGFR und die Bande bei 130 kDa den unglykosylierten EGFR darstellt. Ling et al. (2009) konnten bereits zeigen, dass Tunicamycin eine unglykosylierte Form des EGFR mit einer Größe von 130 kDa generiert (Ling et al., 2009). Dies konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich zur Bande des glykosylierten EGFR (170 kDa) ergab eine Tunicamycin-Behandlung eine zweite Bande mit einer Größe von 130 kDa (Abbildung 20a).

Um den Einfluss von TUSC3 und Tunicamycin auf den EGFR näher zu untersuchen, wurde eine Zeitkinetik durchgeführt. Hierzu wurden SW480-Zellen mit einem Leervektor-Plasmid oder TUSC3 transfiziert. Als Kontrolle dienten transfizierte, nicht behandelte Zellen. 48 h nach der Transfektion wurde den Zellen für ca. 16 h das Nährmedium entzogen. Währenddessen wurden die Zellen mit Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt. Danach wurden sie für 0 min, 30 min und 180 min einem Serumschock mit 20 % FBS ausgesetzt (Abbildung 20). Dies diente der Aktivierung des EGFR und anschließender Endozytose, welche über Clathrin-beschichtete Einstülpungen der Plasmamembran („clathrin-coated pits“) vermittelt wird.

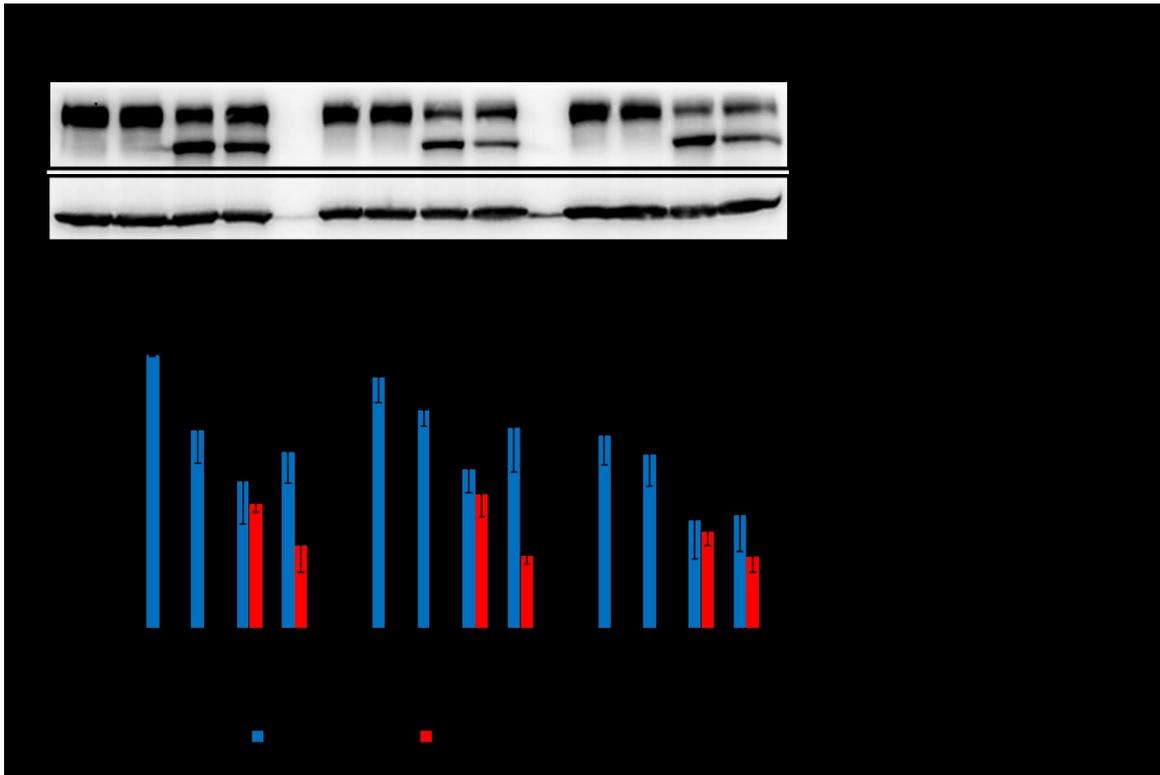


Abbildung 20: Einfluss von TUSC3 und Tunicamycin auf die Glykosylierung des EGFR

Die SW480-Zellen wurden mit Leervektor (EV) oder TUSC3-Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde den Zellen für 16 h das Nährmedium entzogen bei gleichzeitiger Behandlung mit 1 µg/ml Tunicamycin. Daraufgehend wurden sie für 0 min, 30 min und 180 min einem Serumschock mit 20 % FBS unterzogen.

a) Repräsentativer „Western Blot“ zur Überprüfung der EGFR Expression in SW480-Zellen. Als Kontrolle wurde ein HSP90-Antikörper verwendet. **b)** Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse mit ImageJ. Blau: glykosylierter EGFR; rot: unglykosylierter EGFR (n=3; *p<0,05 Tunicamycin + EV gegen Tunicamycin + TUSC3, T-Test).

Auch bei diesem Versuch führte eine Tunicamycin-Behandlung zu deutlich schwächeren Signalen des glykosylierten EGFR im Vergleich zu unbehandelten Proben. Eine quantitative Analyse des „Western Blots“ ergab ein kongruentes Ergebnis (Abbildung 20b). Im Vergleich zu einer Transfektion mit einem Leervektor wurde die unglykosylierte Form des EGFR in Anwesenheit von TUSC3 und gleichzeitiger Tunicamycin-Behandlung nach 30 min Serumschock signifikant geringer exprimiert (EV: $0,49 \pm 0,08$; TUSC3: $0,26 \pm 0,03$; *p=0,046). Somit konnte gezeigt werden, dass TUSC3 die inhibitorische Wirkung von Tunicamycin auf die EGFR-Glykosylierung aufheben kann. Aufgrund dieses Untersuchungsergebnisses wird davon ausgegangen, dass TUSC3 die EGFR-Signalisierung und die subzelluläre Kompartimentierung durch Glykosylierung reguliert.

3.11. Lokalisation von TUSC3 am endoplasmatischen Retikulum

Im weiteren Verlauf der Forschungsarbeiten sollte mit Bezug auf die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche die Lokalisation von TUSC3 bestimmt und der direkte Einfluss von TUSC3 auf Proliferation, Überleben und Apoptose überprüft werden. In früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass TUSC3 im Ovarialkarzinom eine Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes ist und am

endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Kratochvílová et al., 2015). Um diese Aussage für das kolorektale Karzinom zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen in unterschiedlichen Kolonkarzinomzelllinien (SW480, HCT116) sowie in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293T) durchgeführt. Hierzu wurde TUSC3 in diesen Zelllinien überexprimiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Färbung des ER erfolgte mit einem Calnexin-spezifischen Antikörper in Grün (Abbildung 21b). Bei Calnexin handelt es sich um ein Membranprotein des ER. Somit wurde in Grün die Lage des ER in der HCT116-Zelle aufgezeigt. Das TUSC3-Protein wurde in Rot dargestellt (Abbildung 21c). Da die Überexpression von TUSC3 nur in wenigen Fällen erfolgreich war und sowohl SW480- als auch HEK293T-Zellen Anzeichen von Apoptose aufwiesen, wurden lediglich erfolgreich transfizierte und vitale HCT116-Zellen zur Auswertung der Immunfluoreszenz herangezogen (Abbildung 21).

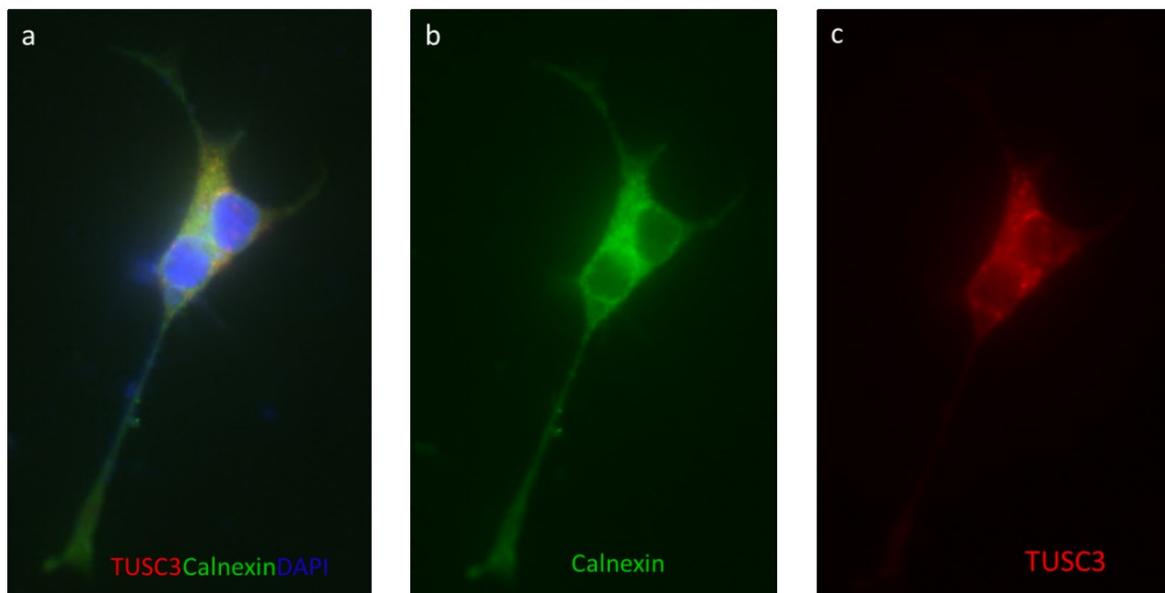


Abbildung 21: Lokalisation von TUSC3 am endoplasmatischen Retikulum in einer kolorektalen HCT116 Zelle

Nach Überexpression von TUSC3 wurden HCT116-Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen.

a) Überlagerung aller Färbungen; TUSC3-Expression (rot), Calnexin-Expression (grün), DAPI (blau). **b)** Färbung des endoplasmatischen Retikulums (Calnexin-Expression) (grün) **c)** Färbung von TUSC3 mit TUSC3-Antikörper (rot).

Abbildung 21 lässt zunächst erkennen, dass TUSC3 in der kolorektalen HCT116-Zelle zytoplasmatisch und nicht im Nukleus lokalisiert ist. Abbildung 21a zeigt weiterhin in einer Überlagerung aller drei Fluoreszenzkanäle eine orange Färbung im Zytoplasma der kolorektalen Zelle, was auf eine Co-Lokalisation des grün gefärbten ER und des rot gefärbten TUSC3-Proteins hindeutet. Somit wurde die Lokalisation von TUSC3 am ER für Kolonkarzinomzellen bestätigt.

3.12. Proliferations- und Überlebenshemmung von kolorektalen Karzinomzellen durch TUSC3

Nachdem wir zeigen konnten, dass TUSC3 die EGFR Signaltransduktion hemmt und vermeintlich eine Rolle als Tumorsuppressor übernimmt, zielte die Arbeit nun darauf ab, die Auswirkung von TUSC3 auf die Proliferation und das Überleben von Karzinomzellen zu untersuchen. Von der Proliferation und dem Überleben von Karzinomzellen ist bekannt, dass sie durch EGFR-Signalgebung reguliert werden (Oda, Matsuoka, Funahashi und Kitano, 2005). Zu diesem Zweck wurden kolorimetrische MTT-Tests durchgeführt, bei denen unterschiedliche Zelllinien mit einem leeren Plasmid (EV), einem SPARC-Plasmid, einem TUSC3-Plasmid oder einer Kombination aus SPARC und TUSC3 transfiziert wurden. Die Messung erfolgte täglich über eine Periode von sieben Tagen. Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 22a dargestellt.

Des Weiteren sollte der Effekt von TUSC3 auf das Wachstum der Zellen unter Einfluss verschiedener Chemotherapeutika ermittelt werden. Hierzu diente ein Zytotoxizitäts-Test (Abbildung 22b-d).

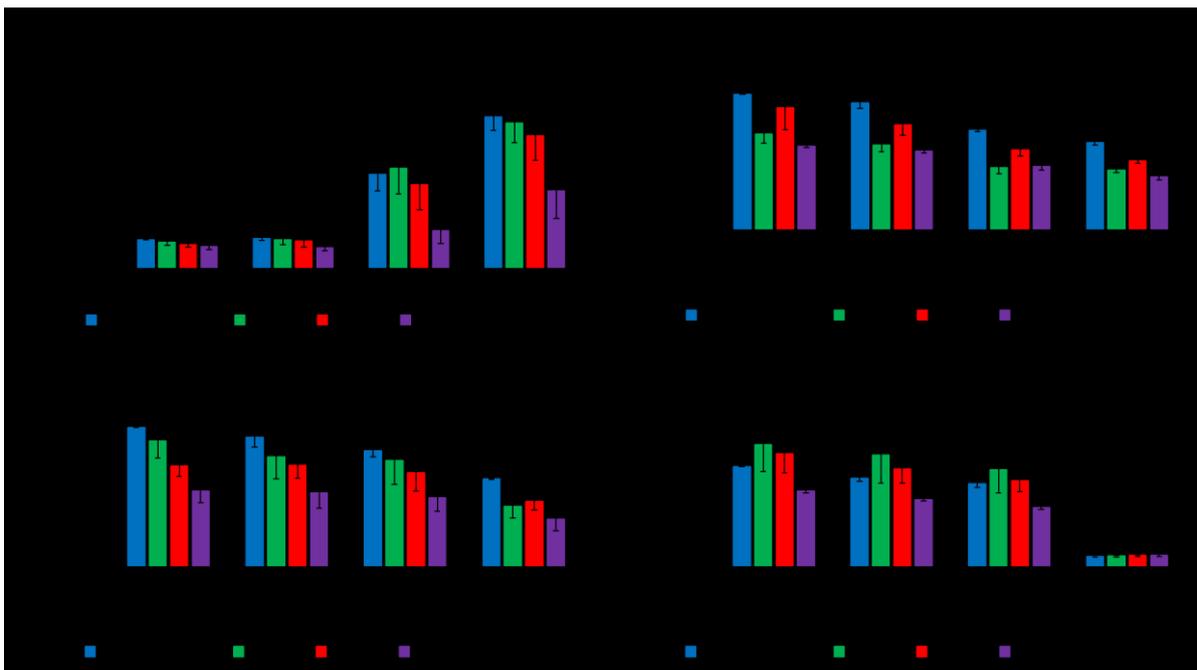


Abbildung 22: Einfluss von TUSC3 auf Proliferation und Wachstum von KRK-Zellen unter Einfluss verschiedener Chemotherapeutika
 SW480-Zellen wurden mit einem Leervektor (EV, blau), SPARC (S, grün), TUSC3 (T, rot) oder einer Kombination aus SPARC und TUSC3 (S+T, violett) transfiziert. Tag 0 entspricht 24 h nach der Transfektion.
a) Proliferations- und Wachstumstest von SW480-Zellen. Nach entsprechender Transfektion der Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen eine MTT-Messung durchgeführt. (n=3; *p<0,05 EV gegen S+T, „two-way“ ANOVA).
b - d) Zytotoxizitätstest der KRK-Zellen unter Einwirkung verschiedener Chemotherapeutika. Eine Messung erfolgte 24 h bzw. 48 h nach Beginn der Behandlung mit Chemotherapeutika. **b)** Anzahl lebender KRK-Zellen nach Behandlung mit 5-FU (0-500 µM) (n=3; *p<0,05 EV gegen S+T und EV gegen SPARC, „two-way“ ANOVA). **c)** Anzahl lebender KRK-Zellen nach Behandlung mit TNF-α (0-100 mg/ml) und Cycloheximid (0,1 µM) (n=3; *p<0,05 EV gegen S+T, „two-way“ ANOVA). **d)** Anzahl lebender KRK-Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel (0-500 µM) (n=3; *p<0,05 EV gegen S+T, T-Test; „two-way“ ANOVA = ns).

Die statistische Auswertung des Proliferations-Tests in SW480-Zellen zeigte ab dem fünften Tag eine signifikante Hemmung der Proliferation im Fall einer Co-Transfektion von SPARC und TUSC3 im

Vergleich zu EV-transfizierten Zellen (EV: $3,3 \pm 0,6$; S+T: $1,3 \pm 0,5$; * $p=0,038$). TUSC3 verlangsamte zwar die Proliferation, konnte sie jedoch nicht wesentlich hemmen. In DLD1-, HCT116- sowie LOVO-Zellen konnte weder bei einer TUSC3-Überexpression noch bei einem TUSC3-„Knockdown“ ein Effekt auf das Zellwachstum beobachtet werden. HEK293T- und HT29-Zellen zeigten ein reziprokes Ergebnis, welches eine nicht-signifikante Steigerung der Zellproliferation im Fall einer Transfektion mit SPARC, TUSC3 oder einer Kombination von beiden Plasmiden zeigte. Der Effekt war jeweils am fünften Versuchstag nach der Transfektion am deutlichsten (Abbildung A3).

Im Zytotoxizitätstest sollte die Zellviabilität verschiedener kolorektaler Zelllinien nach Transfektion mit den oben genannten Plasmiden und einer Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika (5-FU, TNF- α + Cycloheximid und Paclitaxel) untersucht werden. Die statistische Auswertung dieses Versuchs zeigte für alle getesteten Substanzen eine deutliche Abnahme der Zellviabilität in den mit „SPARC + TUSC3-transfizierten“ Zellen (* $p<0,05$) im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen. Die Zellen, welche mit 5-FU behandelt wurden, zeigten diesen Effekt zusätzlich in den mit SPARC transfizierten Zellen. Selbst ohne Einsatz von Chemotherapeutika (0 μ M) konnte eine beträchtliche Stagnierung im Wachstum von SPARC- und TUSC3-co-transfizierten KRK-Zellen verzeichnet werden.

In HCT116-Zellen wurde eine signifikante Abnahme der Zellviabilität bei einer Behandlung mit 0,1 μ M Paclitaxel in den mit SPARC + TUSC3 transfizierten Zellen festgestellt (EV: $0,51 \pm 0,03$; S+T: $0,44 \pm 0,02$; * $p=0,039$) (Abbildung A4b). Ebenfalls eine markante Abnahme konnte in den mit TUSC3 transfizierten Zellen beobachtet werden, die mit 0,1 μ M 5-FU behandelt wurden (EV: $1,00 \pm 0,02$; S+T: $0,93 \pm 0,02$; * $p=0,043$) (Abbildung A4a). Bei Betrachtung der anderen Zelllinien (HEK293T, DLD1, LOVO, HT29), welche mit TNF- α behandelt wurden, war kein Einfluss auf die Viabilität der Zellen feststellbar (Abbildung A4c-f). Dieser Versuch demonstriert somit eine signifikante Inhibition der Proliferation und einen statistisch eindeutigen Rückgang in der Anzahl lebender Kolonkarzinomzellen durch SPARC und TUSC3 – unabhängig vom Einsatz von Chemotherapeutika.

3.13. TUSC3 vermittelte Apoptose in Kolonkarzinomzelllinien

Die Immunfluoreszenzfärbungen lieferten eindeutige Hinweise, dass TUSC3 an der Apoptose beteiligt ist.

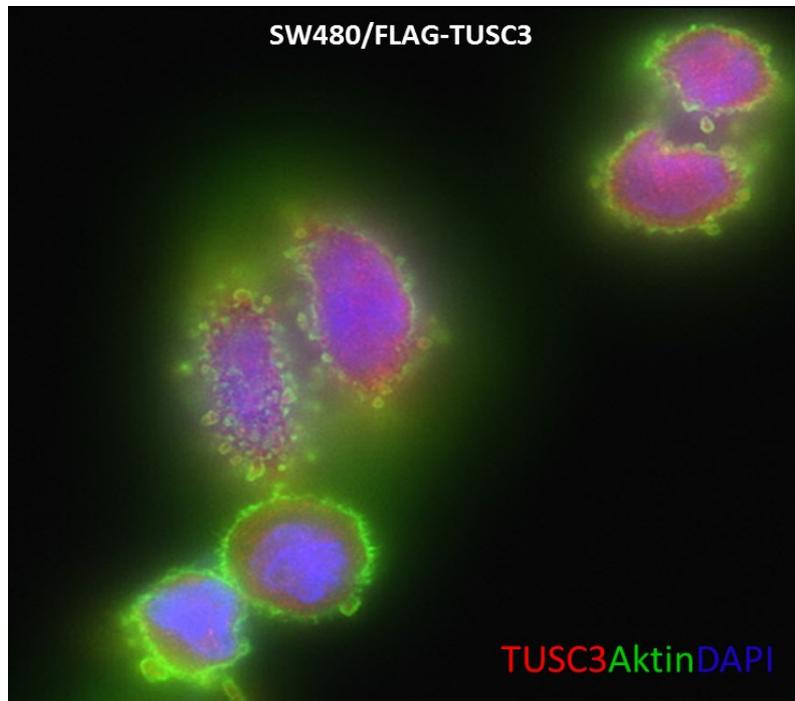


Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von TUSC3 auf die Apoptose in Kolonkarzinomzellen
SW480-Zellen wurden mit einem TUSC3-Plasmid transfiziert. Nachfolgend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Rot: TUSC3; grün: Phalloidin (Aktin); blau: DAPI (Nuklei).

Die Immunfluoreszenzfärbung der SW480-Zellen zeigte eine runde Morphologie mit ausgeprägter Zeiose, was auf ein Einsetzen der Apoptose hindeutet (Abbildung 23). Diese Beobachtung sollte in unterschiedlichen Zelllinien (SW480, HEK293T und HCT116) auf Proteinebene überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen mit Leervektor (EV) oder TUSC3-Plasmid (ohne bzw. mit „Flag-Tag“) transfiziert und die Proteine nach 24 h, 48 h, 72 h und 144 h geerntet, um anschließend in einer „Western Blot“-Analyse mittels Apoptose-spezifischem PARP-Antikörper (89 kDa) eingesetzt werden zu können. Abbildung 24a zeigt exemplarisch einen „Western Blot“ eines Versuches mit HCT116-Zellen. Als Ladekontrolle wurde ein HSP90-Antikörper verwendet. Eine quantitative Auswertung der Ergebnisse ist in Abbildung 24 dargestellt.

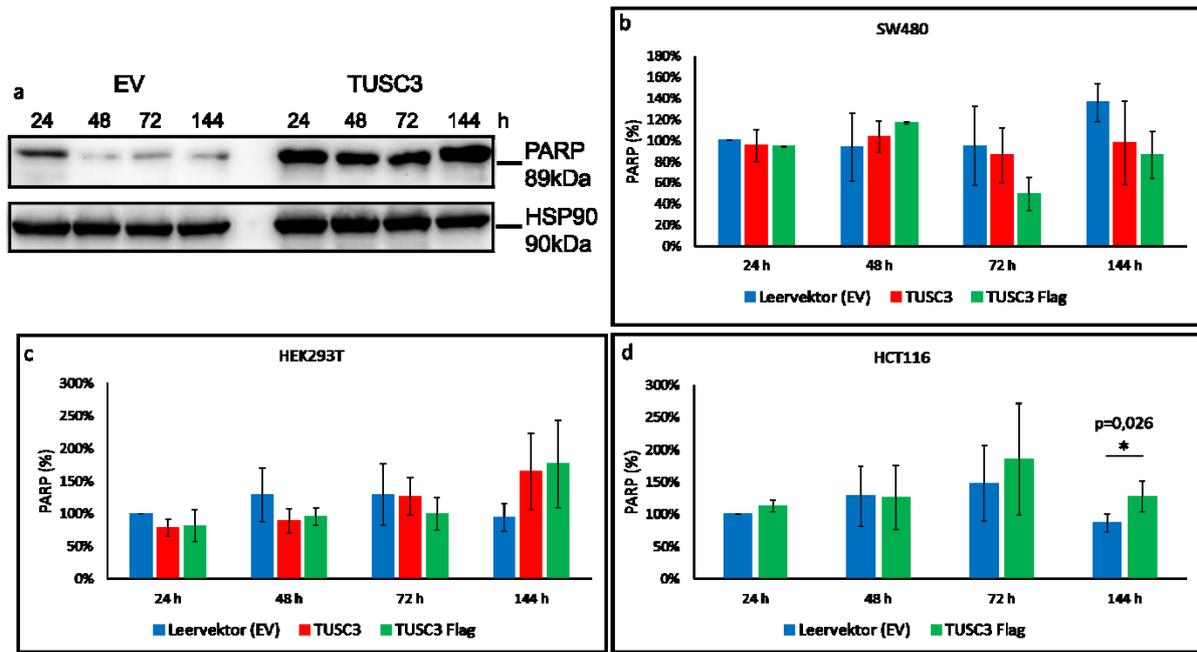


Abbildung 24: „Western Blot“-Analyse zur Untersuchung der TUSC3-vermittelten Apoptose in Kolonkarzinomzellen

Quantitative Analyse der „Western Blot“-Resultate mit ImageJ zur Ermittlung der Rolle von TUSC3 bei der Apoptose mittels PARP-Antikörper. SW480-, HEK293T- und HCT116-Zellen wurden mit Leervektor (EV, blau) oder TUSC3-Plasmid (rot) bzw. TUSC-Flag (grün) transfiziert und die Proteine nach 24 h, 48 h, 72 h und 144 h isoliert. **a)** „Western Blot“-Analyse in HCT116-Zellen mittels PARP-Antikörper (89 kDa). Zur Kontrolle diente HSP90 (90 kDa). EV: Leervektor. **b)** Quantitative Analyse der Rolle von TUSC3 bei der Apoptose in SW480-Zellen. **c)** Quantitative Analyse der Rolle von TUSC3 bei der Apoptose in HEK293T-Zellen. **d)** Quantitative Analyse der Rolle von TUSC3 bei der Apoptose in HCT116-Zellen. (n=3; *p<0,05 EV gegen TUSC3-Flag, T-Test; „two-way“ ANOVA = ns).

Die quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse ergab keinen eindeutigen Einfluss von TUSC3 auf die Expression des Apoptosemarkers PARP in SW480-Zellen (Abbildung 24b). Dies bestätigte sich ebenfalls in HEK293T-Zellen. Hier konnte lediglich eine leicht erhöhte Expression von PARP in Anwesenheit von TUSC3 144 h nach Transfektion beobachtet werden (Abbildung 24c). Nur in HCT116-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied 144 h nach Transfektion ermittelt werden. Hier zeigte sich eine gesteigerte PARP-Expression durch TUSC3 im Vergleich zu einer Transfektion mit Leervektor (EV: $0,87 \pm 0,14$; TUSC3: $1,27 \pm 0,24$; *p=0,026) (Abbildung 24d). Somit ergab dieser Versuch, dass TUSC3 in HCT116-Zellen die Expression des pro-apoptotischen Proteins PARP signifikant erhöht und damit die Apoptose fördert.

3.14. Korrelation der TUSC3-Proteinexpression und der Therapieantwort auf Cetuximab

Des Weiteren galt es eine mögliche Korrelation zwischen der TUSC3-Expression und der Therapieantwort auf Cetuximab zu analysieren. Hierzu sollte in einer immunhistochemischen Färbung kolorektalen Tumorgewebes verschiedener Patienten, die mit Cetuximab behandelt wurden, die TUSC3-Expression überprüft werden. Im Vorfeld war bekannt, welche der 17 untersuchten Patienten auf eine Cetuximab-Therapie ansprachen (11x „Responder“) und welche nicht (6x „Non-Responder“). Darüber hinaus sollte gleichzeitig die Lokalisation von TUSC3 im Tumorgewebe ermittelt werden. Repräsentative immunhistochemische Färbungen sind in Abbildung 25 dargestellt, Tabelle 19 zeigt die quantitative Auswertung der Färbungen. Ein Ansprechen auf Cetuximab wurde nach den „RECIST Restaging“ (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)-Kriterien mit einem Grenzwert von 10 Monaten progressionsfreiem Überleben (PFS) ermittelt. Es handelt sich dabei um ein Kriterium für die Bewertung des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren. Dies bedeutet laut klinischer Definition des Uniklinikums Mannheim, dass es sich bei Patienten mit < 10 Monaten PFS um „Non-Responder“ und bei Patienten mit > 10 Monaten PFS um „Responder“ handelt.

Tabelle 19: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Analyse bezüglich der TUSC3-Expression in humanem kolorektalen Tumorgewebe

	„Responder“	„Non-responder“
TUSC3 positiv	5	3
TUSC3 negativ	6	3
Gesamt	11	6

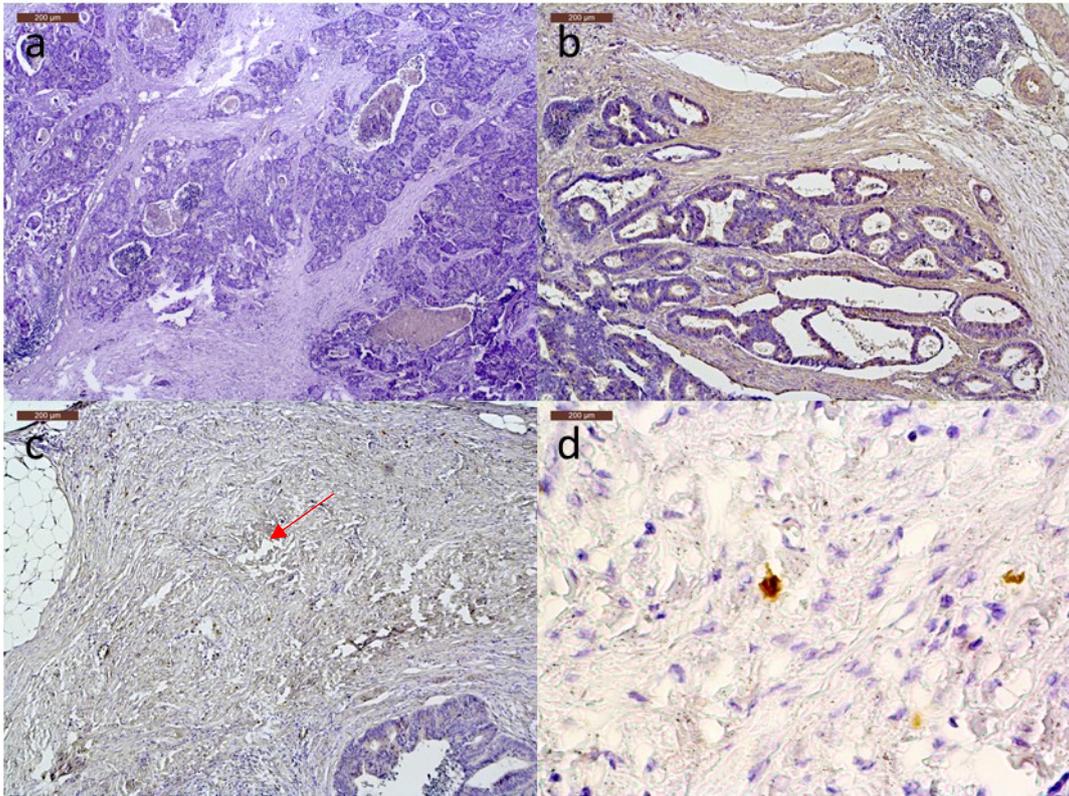


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung zur Analyse der TUSC3-Expression in humanem kolorektalem Tumorgewebe

Gewebeschnitte von kolorektalem Tumorgewebe verschiedener Patienten wurden mit TUSC3 immunhistochemisch gefärbt. Bei allen Gewebeschnitten handelt es sich um Proben von Patienten, welche mit Cetuximab behandelt wurden, wobei nicht alle auf die Therapie ansprachen. **a)** Gewebeschnitt ohne TUSC3-Expression, Vergrößerung 25x. **b)** TUSC3 wird sowohl in Stroma als auch im Tumorgewebe exprimiert, Vergrößerung 50x. **c)** TUSC3-Expression lediglich im Stroma, Vergrößerung 50x. **d)** Vergrößerung von **c)**, 200x.

Die in Abbildung 25 bzw. Tabelle 19 dargestellten Ergebnisse zeigten eine TUSC3-Expression im Tumorgewebe bei fünf der elf „Responder“. Darüber hinaus konnte TUSC3 im Tumorgewebe bei 50 % der „Non-Responder“ nachgewiesen werden. Abbildung 25 zeigt des Weiteren ein diffuses TUSC3-Vorkommen im Stromagewebe, jedoch keine nukleäre TUSC3-Expression. Aufgrund der geringen Fallzahl lässt sich hier keine Korrelation zwischen TUSC3-Expression und der klinischen Antwort auf eine EGFR-Therapie feststellen. Umfassendere klinische Studien sind daher notwendig, aber nicht Gegenstand vorliegender Dissertation.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Tumorsuppressorkandidaten 3 (*TUSC3*) im kolorektalen Karzinom (KRK) epigenetisch und funktionell zu untersuchen, da seine molekulare Funktion im KRK zu diesem Zeitpunkt nicht erforscht war.

TUSC3-Hypermethylierung im kolorektalen Gewebe

Der erste Blick galt der epigenetischen Regulation von *TUSC3*. Eine bereits vorangegangene Studie hatte gezeigt, dass *TUSC3* eine erhöhte Promotormethylierung im Tumorgewebe von KRK-Patienten aufweist. In dieser angesprochenen Studie wurden 74 Patientenproben mittels MethyLight-Methode analysiert, wovon 26 eine signifikant höhere Methylierung im Tumorgewebe aufwiesen (Tänzer, 2012).

In der hier vorliegenden Dissertation sollte dieses Ergebnis verifiziert und zusätzlich eine mögliche Abhängigkeit vom Alter der Patienten untersucht werden. Es wurde daher ebenfalls eine MethyLight-Analyse mit fünf Patientenproben durchgeführt, durch die gezeigt werden konnte, dass alle Tumorproben eine höhere Methylierung aufwiesen, was das Ergebnis von Tänzer (2012) bestätigte. Da in der vorliegenden Arbeit zunächst nur fünf Patienten untersucht worden waren, wurde die Patientenzahl nachfolgend auf zehn Patienten erhöht, zudem wurde eine andere Methode angewandt. Mittels „Next Generation Sequencing“, einer deutlich sensitiveren Methode, konnten die vorherigen Resultate einer gesteigerten *TUSC3*-Methylierung im Tumorgewebe bestätigt und die Unterschiede sogar noch deutlicher gemacht werden. So konnte jetzt bei 80 % der untersuchten Patientenproben eine gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöhte DNA-Methylierung in der *TUSC3*-Promotorregion im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Methylierungsuntersuchungen zeigten somit, dass die von Tänzer (2012) und auch hier verwendete MethyLight-Analyse zwar einen Trend erkennen lassen, der auf einen Anstieg der Methylierung im Tumorgewebe hindeutet, die „Next Generation Sequencing“-Methode aber eine noch höhere Genauigkeit aufweist und für ein signifikantes Ergebnis sorgt. Die Folge einer solchen Hypermethylierung ist, dass diese im Allgemeinen für eine Inaktivierung von Genen und damit in der Folge auch für eine verminderte Produktion der entsprechenden Proteine sorgt, was im Falle von Tumorsuppressorgenen pro-karzinogene Folgen hat (Baylin, Herman, Graff, Vertino und Issa, 1998).

In Bezug auf das Alter konnte im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methylierungsanalysen mittels MethyLight und „Next Generation Sequencing“ keine Abhängigkeit festgestellt werden. So war weder im Tumor- noch im Normalgewebe ein Unterschied in der Methylierungsrate zwischen den jungen (35 - 47 Jahre) und den alten (85 - 91 Jahre) Patienten zu beobachten. Dies widerspricht den Ergebnissen von Ahuja et al. (1998), bei der 16 Patienten im Alter

zwischen ca. 15 Jahren und 95 Jahren untersucht wurden und ein höheres Alter mit einer erhöhten Methylierung korrelierte. Allerdings wurde dort eine weniger sensitive Methode („Methylation specific PCR“ [MSP]) verwendet, die nur semiquantitativ ist. In Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnte auch Tänzer (2012) keine Altersabhängigkeit feststellen, was auf eine zu geringe Altersspanne der Patienten zurückgeführt wurde, da in der Studie von Tänzer (2012) fast alle Patienten älter als 50 Jahre waren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch bei einer größeren Altersspanne der Patienten von 35 Jahren bis 91 Jahren keine eindeutige Korrelation zwischen der Methylierungsrate im Tumorgewebe und dem Alter aufgezeigt werden. Die Fallzahl war hier zwar relativ klein, es wird dennoch vermutet, dass die Hypermethylierung des TUSC3-Promotors unabhängig vom Alter des Patienten ist und stattdessen vielmehr von biologischen Prozessen aufgrund des Tumors abhängt.

In einer früheren Untersuchung mit Ovarialkarzinomzellen konnte bei ca. 30 % aller Patienten eine TUSC3-Promotor-Hypermethylierung nachgewiesen werden (Pils et al., 2013). Des Weiteren konnte dort ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Methylierung des TUSC3-Promotors und einer verminderten mRNA-Expression von TUSC3 belegt werden (Pils et al., 2013). Demzufolge sollte eine erhöhte Methylierung des TUSC3-Promotors sich auch in einer verminderten Proteinexpression von TUSC3 niederschlagen.

Um dies zu prüfen, wurden im Rahmen dieser Dissertation „Western Blot“-Analysen von Patientenproben durchgeführt. Die „Western Blot“-Analysen bestätigten eindeutig die Abhängigkeit der TUSC3-Proteinexpression von der Promotormethylierung. In 70 % aller Tumorgewebeproben der Patienten war die Proteinmenge deutlich vermindert oder TUSC3 überhaupt nicht mehr nachweisbar. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die zuvor ermittelte Hypermethylierung in den Tumorzellen zurückzuführen und bestätigt damit die Annahme, dass die TUSC3-Promotorhypermethylierung die mRNA-Expression und damit die konsekutive Proteinexpression von TUSC3 vermindert, was die Rolle von TUSC3 als Tumorsuppressor untermauert. Es bleibt damit festzuhalten, dass es im kolorektalen Karzinom durch die Hypermethylierung des TUSC3-Promotors zu einer epigenetischen Abschaltung des *TUSC3*-Gens und in der Folge damit auch zu einem Verlust des TUSC3-Proteins kommt.

Die Funktion von TUSC3 im onkogenen Signaling am Beispiel des EGFR/HER1:

Im weiteren Zuge der Dissertation wurde die Funktion von TUSC3 im onkogenen Signaling am Beispiel des EGFR, der zur ERBB-Familie gehört, untersucht. Die ERBB-Familie besteht aus vier Rezeptor-Tyrosinkinasen. Bekannte Mitglieder sind dabei HER2 und EGFR/HER1, die zusätzlich klinische Zielstrukturen für inhibitorische Antikörpertherapien (Cetuximab, Trastuzumab) darstellen (Reid, Vidal, Shaw und de Bono, 2007). Alle vier Tyrosinkinasen ähneln sich in ihrem Aufbau. Sie haben eine hydrophobe Transmembrandomäne, eine ligandenbindende Domäne, sowie eine Tyrosinkinase-Domäne (Wells, 1999). Eine Aktivierung der ERBB-Rezeptoren erfolgt durch bestimmte Liganden, die der EGF-Familie angehören (Citri und Yarden, 2006). Die EGF-zugehörigen Wachstumsfaktoren werden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bindet nur an den EGFR und beinhaltet EGF, TNF- α und Amphiregulin. Die zweite Gruppe beinhaltet Betacelulin, Heparin gebundenes EGF sowie Epirgulin, welches auch an den EGFR binden kann (Yarden, 2001). Die letzte Gruppe besteht aus Neuregulinen, welche an HER3 oder HER4 binden (Harari et al., 1999).

Durch die Vielzahl an Liganden besteht eine hohe Signaldiversität bei der ERBB-Familie. Die Ligandenbindung löst eine Dimerisierung des EGFR aus, die zu einer Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinasen und so zu einer Auto- oder Transphosphorylierung von Tyrosin-Resten im zytoplasmatischen Abschnitt der Rezeptor-Tyrosinkinase führt (Citri und Yarden, 2006). Durch den aktivierten EGFR werden Adapterproteine, Phosphatasen und Kinasen rekrutiert. Diese leiten Signale vom Rezeptor über verschiedene nachgeschaltete Signalwege bis zum Kern weiter. Dies sorgt dafür, dass unterschiedliche biologische Funktionen reguliert werden, unter anderem die Proliferation, das Überleben der Zelle und die Angiogenese (Baselga und Hammond, 2002; Yarden und Sliwkowski, 2001). Die bekanntesten Signalwege des EGFR sind dabei RAS/RAF/ERK und PI3K/AKT, welche in nachfolgender Abbildung (Abbildung 26) dargestellt sind (Singh und Harris, 2005).

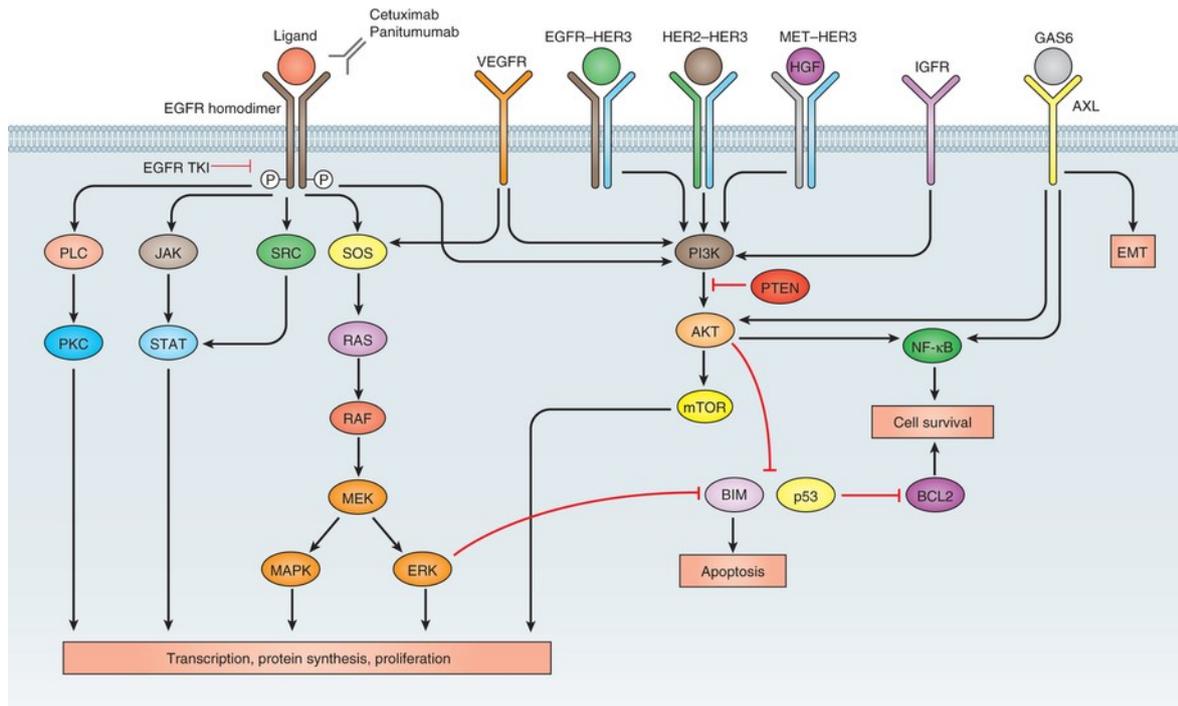


Abbildung 26: Signalwege der ERBB-Familie

Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege der ERBB-Familie, die verschiedene biologischen Funktionen wie Proliferation, Apoptose oder das Überleben der Zelle steuern (Chong und Jänne, 2013).

Die N-Glykosylierung von GFRs wie EGFR/HER1 sorgt für den korrekten Einbau dieser Transmembranproteine in die ER-Membran (Stroop, Weber, Gerwig, Nimtz, Kamerling und Vliegenthart, 2000). Außerdem reguliert die N-Glykosylierung den Transport vom ER zum Golgi sowie den lysosomalen Abbau oder das endosomale Recycling von GFRs. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung, indem es die Bildung des Oligosaccharid-Dolicholkomplexes hemmt.

TUSC3 beeinflusst Gene der N-Glykosylierung und der Apoptose

Zur Untersuchung der Funktion von TUSC3 im onkogenen Signaling, insbesondere bei der N-Glykosylierung, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine „Microarray“-Analyse durchgeführt. Die Analyse erlaubte neben der Untersuchung des Einflusses von TUSC3 auf die N-Glykosylierung von EGFR gleichzeitig auch eine Betrachtung anderer Prozesse, wie der Proteinprozessierung am ER oder dem Medikamentenstoffwechsel, an denen TUSC3 beteiligt sein könnte. So zeigten dort außergewöhnlich viele Gene dieser Vorgänge einen Einfluss durch TUSC3, dieser war allerdings nicht signifikant. Die Analysen deuteten darauf hin, dass TUSC3 an der N-Glykosylierung beteiligt ist. So wurde eine relativ starke Herunterregulierung der Gene *MGAT1* und *MGAT3* beobachtet. Die weitere Analyse von *MGAT1* und *MGAT3* mittels RT-qPCR bestätigte die Reduktion der Genexpression durch *TUSC3*. Bei *MGAT1* handelt es sich um ein Gen, welches für ein Transmembranprotein kodiert, dass am Golgi lokalisiert ist

und eine katalytische Domäne im Lumen hat (Pownall et al., 1992). Es katalysiert den ersten Schritt der Umwandlung von Oligomannose zu einem N-Glykan und ist somit, wie TUSC3, ebenfalls an der N-Glykosylierung beteiligt (Schachter, 1986). Auch *MGAT3* kodiert für eines der wichtigsten Enzyme, die an der Regulierung der Protein-Glykosylierung mitwirken. Das Produkt des *MGAT3*-Gens ist die N-Acetylglukosaminyltransferase III (GlcNAc-TIII). Sie dient zur Übertragung von N-Acetylglukosamin an die Kern-Mannose von komplexen N-Glykanen (Nishikawa, Ihara, Hatakeyama, Kangawa und Taniguchi, 1992). Daraus ergibt sich, dass TUSC3 sowohl einen direkten Einfluss als Bestandteil der OST als auch einen indirekten Effekt auf das Trimmen der komplexen Zuckerreste bei der N-Glykanbildung hat.

Die „Microarray“ Analyse zeigte außerdem eine Beeinflussung der an der Apoptose beteiligten Gene *BCL2* und *BAK1* durch *TUSC3*. Der dort beobachtete Rückgang der *BCL2*-Expression konnte ebenfalls durch die RT-qPCR bestätigt werden. Bei *BCL2* handelt es sich um ein Gen, das für ein Protein kodiert, welches das Überleben der Zelle fördert und die Apoptose hemmt (Chao und Korsmeyer, 1998). Bei *BAK1* zeigte sich ein umgekehrter Einfluss von TUSC3. Die Analyse ergab sowohl im „Microarray“ als auch bei der RT-qPCR eine Hochregulierung von *BAK1* durch TUSC3. *BAK1* gehört ebenfalls zur BCL2-Familie, kodiert für ein pro-apoptotisches Protein und induziert demzufolge die Apoptose (Chittenden et al., 1995). Bei einem TUSC3-bedingten Anstieg der *BAK1*-Genexpression steigert sich folglich die Apoptose und wird ein schnelleres Absterben der Tumorzellen ausgelöst. Die negative Regulierung des apoptosehemmenden *BCL2*-Gens sowie die Förderung des pro-apoptotischen *BAK1*-Gens unterstützen die These, dass es sich bei TUSC3 um einen Tumorsuppressor handelt. Die Beteiligung von TUSC3 an der N-Glykosylierung und der Apoptose lassen außerdem den Schluss zu, dass TUSC3 für die metabolische Homöostase der Zelle von Bedeutung ist. Es konnte bereits zuvor der Haupteffektorweg von TUSC3 in Prostata-, Eierstock- und Bauchspeicheldrüsenkrebszellen gezeigt werden (Fan et al., 2016; Horak et al., 2014; Pils et al., 2013). Dieser umfasste die Kontrolle der ER-Stressantwort über Modulation von MGAT-Enzymen und BCL-Proteinen, die am Zellüberleben und der Regulation der Apoptose beteiligt sind (Lau und Dennis, 2008). Eine Regulation von MGAT und BCL durch TUSC3 konnte auch bei dieser Arbeit in KRK-Zellen bestätigt werden. Als wichtiges weiterführendes Ergebnis enthüllen die neuen Daten zusätzlich zu diesem etablierten Weg auch molekulare Verbindungen zwischen Veränderungen in der Glykosylierung und einem Karzinom.

TUSC3 inhibiert die EGFR Phosphorylierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Weiteren außerdem der direkte Einfluss von TUSC3 auf den EGFR untersucht werden. Hierzu wurden zunächst die N- und die C-terminale Domäne des EGFR sowie der

phosphorylierte EGFR im Gesamtzelllysat von SW480-, HCT116- und LOVO-Zellen untersucht. Es zeigte sich weder bei der „Western Blot“-Untersuchung der intrazellulären Domäne des EGFR im Gesamtzelllysat mit dem C-terminalen EGFR-Antikörper, noch bei der Quantifizierung der Gesamtmenge an EGFR an der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran mit dem N-terminalen EGFR-Antikörper in der FACS-Analyse ein Effekt von TUSC3 auf den EGFR in den Kolonkarzinomzelllinien. Die Untersuchung der p-EGFR-Expression deutete hingegen auf eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung des EGFR durch TUSC3 hin. Diese Hemmung war sowohl in den mit TUSC3 überexprimierten Zellen als auch bei abgeschaltetem TUSC3 („Knockdown“) sichtbar, vor allem nach einer längeren Zeit des Serumschocks. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von p-EGFR mit einer schlechteren Überlebensrate der Patienten korreliert (Mitsui et al., 2014). Da TUSC3 die Phosphorylierung des EGFR hemmt, sorgt es dafür, dass Signale über die nachfolgenden RAS/RAF/ERK- und PI3K/AKT-Signalwege nicht übermittelt und so die Proliferation und das Überleben der Tumorzelle unterbunden werden, was sich im Umkehrschluss positiv auf die Überlebensrate der Tumorpatienten auswirken dürfte. Durch die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur p-EGFR-Expression, mittels „Western Blot“-Analyse und Überexpression bzw. „Knockdown“ von TUSC3, konnte außerdem gezeigt werden, dass TUSC3 die Phosphorylierung des EGFR an der C-terminalen Domäne, die für die Dimerisierung und die Initiierung der stromabwärtigen Signalübertragung verantwortlich ist, inhibiert, ohne ihre Anwesenheit an der Plasmamembran oder den Abbau des Rezeptors zu verändern.

TUSC3 beeinflusst das Aufkommen an nukleärem EGFR

Um den Einfluss von TUSC3 auf das Aufkommen des phosphorylierten und nicht phosphorylierten EGFR in den verschiedenen Zellkompartimenten näher zu untersuchen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung von SW480-Zellen durchgeführt, bei der eine zytosolische Fraktion, eine nukleäre Fraktion sowie eine Fraktion mit den unlöslichen Zellbestandteilen (Matrix, Zytoskelettproteine, Kernmembranen, DNA, ER) erhalten wurde. Die verschiedenen Fraktionen wurden hinsichtlich der Expression von un- bzw. phosphoryliertem EGFR mittels „Western Blot“-Analyse untersucht. Diese Untersuchung zeigte eine signifikante Abnahme des EGFR in der nukleären Fraktion, wenn TUSC3 exprimiert wurde. In den anderen Fraktionen gab es keine Hinweise auf eine Änderung der EGFR-Kompartimentierung. Die Überexpression von TUSC3 führte zu einer Reduktion der p-EGFR-Expression in allen Fraktionen. Der inhibitorische Effekt von TUSC3 auf die p-EGFR-Expression war für die zytosolische und die nukleäre Fraktion signifikant. Demnach kommt es in Abwesenheit von TUSC3 zu einer deutlichen Erhöhung der nukleären EGFR- und p-EGFR-Expression. Die Kontrollen mittels Transferrinrezeptor (CD71)-Antikörper zeigten, dass TUSC3 keine Wirkung auf das Transferrinrezeptor-

Protein hatte und eine potentielle Spezifität von TUSC3 in Richtung EGFR und keinen anderen Rezeptor, der auf die gleiche Weise die Endozytose vermittelt wie der EGFR, aufzeigt. Es wurde bereits seit einigen Jahren eine Vielzahl an Studien durchgeführt, die n-EGFR immer wieder mit unterschiedlichen Karzinomen in Verbindung bringen. So erfolgte ein erster Bericht über die Kernlokalisierung von EGFR vor mehr als zwei Jahrzehnten. Dabei ging es um die Regeneration von Leberzellen sowie das primäre adrenokortikale Karzinom (Kamio, Shigematsu, Sou, Kawai und Tsuchiyama, 1990; Marti et al., 1991). Des Weiteren wurde eine Kernexpression von EGFR im Uterus von Mäusen, in Rattenleber, in der humanen Schilddrüse und in immortalisierten Epithelzellen des menschlichen Ovars und der Nieren nachgewiesen (Cao, Lei, Bian und Rao, 1995; Lin et al., 2001; Marti et al., 2001). In vielen unterschiedlichen Tumoren wurde ein hohes Aufkommen an nukleärem EGFR ermittelt. Dazu zählen das Blasen- und Cervixkarzinom, aber auch adrenokortikale Karzinome, Schilddrüsenkarzinome und Karzinome in der Mundhöhle (Kamio et al., 1990; Lipponen und Eskelinen 1994; Lo et al., 2005/1; Lo, Xia, Wei, Ali-Seyed, Huang und Hung, 2005/2; Marti et al., 2001; Psyrrri et al., 2005). Einige Studien weisen darauf hin, dass der nukleäre EGFR in phosphorylierter Form einen intakten Rezeptor darstellt (Cordero et al., 2002; Dittmann et al., 2005; Lin et al., 2001). Trotz einer bis dato guten Dokumentation der Kernlokalisierung war der Transportmechanismus des EGFR von der zytoplasmatischen Membran in den Zellkern zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Im letzten Jahrzehnt wurden jedoch viele Untersuchungen durchgeführt, um diesen Transportmechanismus zu ermitteln. So wurden u.a. Hinweise für einen bislang unbekanntem Mechanismus gefunden, dass der EGFR internalisiert und zum Kern transportiert wird, anstatt abgebaut oder recycelt zu werden (Brand, Iida, Li und Wheeler, 2011). Die Studien ergaben, dass der Transport des EGFR unter anderem durch Dynamin-abhängige Rezeptor-Endozytose über Clathrin-beschichtete Membraneinstülpungen erfolgt. Der postulierte Zusammenhang zwischen dem Transport des EGFR und anderen endosomalen Markern wird durch die Untersuchungen von De Angelis Campos, Rodrigues, de Andrade, de Goes, Nathanson und Gomes (2011) und Lo, Ali-Seyed, Wu, Bartholomeusz, Hsu und Hung (2006) bestätigt. Die Autoren gehen ebenfalls davon aus, dass an der nukleären Translokation des EGFR eine Endozytose und eine nachfolgende endosomale Sortierung beteiligt sind (De Angelis Campos et al., 2011; Lo et al., 2006). Diese Studien deuten darauf hin, dass der Transport des EGFR mittels Endozytose erfolgt. Auf welche Weise der EGFR von den Vesikeln zum Kern transportiert wird, blieb im Rahmen der Studien jedoch unklar. Wang et al. (2010) identifizieren hingegen einen retrograden ER-Golgi-Weg, welcher von Oberflächen-Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) genutzt wird und über den der EGFR den Kern über einen membranassoziierten Weg vom Golgi zur ER-Membran erreicht (Wang et al., 2010).

Eine der Hauptfunktionen des nukleären EGFR ist es, als transkriptioneller Co-Aktivatoren für verschiedene Onkogene zu agieren (Lin et al., 2001). Zu diesen zählen unter anderem Cyclin D1 (Lin et al., 2001), die Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Lo et al., 2005/1) und c-Myc (Jaganathan, Yue, Paladino, Bogdanovic, Huo und Turkson, 2011). Diese stehen in Verbindung mit Arzneimittelresistenzen, Tumorgenese oder Entzündungsprozessen (Lee, Wang und Hung, 2015). Da der EGFR keine DNA-Bindungsdomäne besitzt, muss er mit anderen Transkriptionsfaktoren (z. B. STATs) kooperieren, um auf diese Weise mit genomischen Regionen zu interagieren (Brand et al., 2011). Der n-EGFR hat eine intrinsische Transaktivierungsaktivität am C-Terminus, welche zur Regulierung verschiedener Zielgen-Promotoren beiträgt. Darüber hinaus übt der EGFR im Kern eine Proteinkinasefunktion aus (Lo, 2010). Dies geschieht durch die EGFR-vermittelte Phosphorylierung von Chromatin-gebundenem „Proliferative-Cell-Nuclear-Antigen“ (PCNA), um so die Proteinstabilität zu erhöhen und seine Funktion aufrechtzuerhalten. Dazu zählen DNA-Replikation und die Reparatur von Schäden (Wang et al., 2006). Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Aufkommen an nukleärem EGFR im Tumorgewebe und schlechten klinischen Ergebnissen bei den Patienten manifestierte sich bereits bei einigen Tumorentitäten. Unter anderem zeigt sich dies beim Ovarialkarzinom (Xia et al., 2009), beim Mammakarzinom (Lo et al., 2005/2), und im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Traynor et al., 2013). Ein erhöhtes Aufkommen an n-EGFR im Tumorgewebe wurde wiederholt mit verschiedenen Therapieresistenzen verknüpft (Lo, 2010). Dazu zählt auch die EGFR-Therapie unter Verwendung von Cetuximab und anderen Tyrosinkinaseinhibitoren des EGFR (EGFR-TKIs). Es konnte bereits eine positive Korrelation zwischen dem Aufkommen an n-EGFR und der Aktivität von „Src-Family-Kinasen“ (SFK) in Verbindung mit Cetuximab-Resistenz aufgezeigt werden. So bewiesen Wheeler et al. (2008), dass die Expression von n-EGFR in Cetuximab-resistenten NSCLC Zellen erhöht ist. Die erhöhte Expression des n-EGFR kann durch einen SFK-Inhibitor geblockt werden und führt zu einer Resensibilisierung gegenüber einer Cetuximab-Therapie (Li, Ida, Dunn, Ghia und Wheeler, 2009). Da die Versuche einen Anstieg an n-EGFR bei Abwesenheit von TUSC3 zeigten, bedeutet dies, dass TUSC3 das Vorkommen von n-EGFR verhindert. Wie bereits erwähnt, hat der n-EGFR einen negativen Einfluss auf die Entstehung von Karzinomen und deren Verlauf.

Neben dem EGFR gibt es auch einige Studien zur Lokalisation von HER3 im Zellkern, dem eine ähnliche Funktion wie dem EGFR zugesprochen wurde (Alimandi et al., 1995). So konnte auch dieses Mitglied der HER-Familie bei verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom oder beim Prostatakarzinom, bei dem es mit der Tumorprogression in Verbindung steht (Koumakpayi et al., 2006), im Kern nachgewiesen werden. Diese Kompartimentalisierung des HER3 kann eine wichtige Rolle spielen, da EGFR nur in Verbindung mit HER3 die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) aktivieren kann.

TUSC3 inhibiert den stromabwärts gelegenen Signalweg des EGFR

Wie bereits erwähnt, führt eine Aktivierung des EGFR zu einer Aktivierung diverser Signalwege, welche die Proliferation steigern und das Überleben der Tumorzelle sichern. Neben dem Effekt von TUSC3 auf den p-EGFR wurde daher auch der Effekt auf nachgeschaltete Gene untersucht. Zu ihnen zählen *AKT* und *ERK1/2*. Da die Halbwertszeit von *AKT* und *ERK1/2* mit einigen Minuten im Vergleich zu der von pro-apoptotischen Signalen nur sehr kurz ist, wurde eine Kurzzeitkinetik durchgeführt, bei der die verwendeten SW480-, HCT116- und HEK293T-Zellen für maximal 30 Minuten mit einem Serumschock stimuliert wurden. Die weitere Analyse mittels „Western Blot“ ergab eine signifikante Hemmung von p-AKT und p-ERK1/2 in Anwesenheit von TUSC3. Daraus lässt sich schließen, dass die Proliferation der Tumorzellen unterbunden wird und die Zellen schneller in Apoptose gehen, wenn TUSC3 in den Zellen vorhanden ist. Diese Erkenntnis unterstützt die Feststellung, dass TUSC3 die Phosphorylierung des EGFR hemmt und folglich die Signale über die nachgeschalteten Signalwege nicht weitergegeben werden können. Darüber hinaus hat die verminderte Aktivität von *AKT*- und *ERK1/2*-Genen Auswirkungen auf die Transkription und Translation von mRNAs. Diese Gene kodieren für Wachstumsfaktoren und andere wichtige Proteine, die das Zellwachstum regulieren (z. B. cyclin D1 oder c-Myc). Das ist ein Grund dafür, warum der RAS/RAF/MEK/ERK-Weg und der PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Weg so einen starken Effekt auf das Zellwachstum haben. In Prostatakarzinomzellen konnte bereits festgestellt werden, dass in Zellen, in denen TUSC3 abgeschaltet wurde, die Aktivität von p-AKT erhöht war. Horak et al. (2014) wiesen auch nach, dass TUSC3 die N-Glykosylierung unter ER-Stress reguliert und eine Veränderung der AKT-Signaltransduktion in Prostatakarzinomzellen zur Folge hat (Horak et al., 2014). Diese Hemmung der p-AKT Aktivität durch TUSC3 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun auch in kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen werden. Da sowohl der RAS/RAF/MEK/ERK-Weg als auch der PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Weg bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen, hat eine Inhibierung dieser Wege einen großen therapeutischen Nutzen. Daher ist der Nachweis einer Inhibierung der EGFR-Signaltransduktion in RAS-Wildtyp-Tumoren durch TUSC3 eine wichtige erste Erkenntnis in Bezug auf die Tumorgenese und die Funktion von TUSC3.

TUSC3 hemmt weitere krebisrelevante Signalwege die mit dem EGFR in Verbindung stehen

Neben dem EGFR/AKT/ERK-Weg wurden in der vorliegenden Arbeit noch andere Tumor-relevante Kaskaden untersucht, die mit dem EGFR-Weg in Wechselwirkung stehen, unter anderem der WNT-Signalweg. Dabei wurden vier verschiedene Reporterplasmide (HRE, SRE, PPRE und TopFlash) genauer untersucht. Das verwendete Plasmid TopFlash ist ein Reporterplasmid für die TCF/LEF-Familie (T-cell-

factor). Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die den WNT-Signalweg vermitteln, indem sie den Co-Aktivator β -Catenin rekrutieren (Barolo, 2006). In dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass TUSC3 die Aktivität von TCF hemmt. Dies bedeutet, dass der WNT-Signalweg in den Karzinomzelllinien nicht vermittelt wird. Die TUSC3-vermittelte duale Inhibition zweier zentraler, antreibender onkogener Wege (WNT und EGFR) könnte in Zukunft von therapeutischem Interesse sein, zumal die Aktivierung des WNT-Wegs eine Hauptmutation des KRKs ist (Morin et al., 1997). WNT und EGFR interagieren während der Tumorgenese. Dies wurde in einigen Tumoren gezeigt, unter anderem im Mammakarzinom, wo eine Überexpression von WNT die Signalkaskade über EGFR aktiviert (Musgrove, 2004). Sowohl WNT als auch die EGFR-Signaltransduktion interagieren mit β -Catenin. Daher ist es möglich, dass WNT und EGFR bei einer gleichzeitigen Wechselwirkung mit β -Catenin miteinander interagieren (Hu und Li, 2010). Aufgrund dieser möglichen Interaktion und der in dieser Arbeit ermittelten Inhibition von WNT und EGFR durch TUSC3 lässt sich schließen, dass TUSC3 eine wichtige Rolle in beiden onkogenen Wegen spielt.

Das andere Reporterplasmid mit signifikantem Anstieg bei Abwesenheit von TUSC3 war das „hypoxia response element“ (HRE). Bei Hypoxie handelt es sich um einen profibrotischen und stressinduzierenden Reiz. „Hypoxia-inducible factor-1“ (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellantwort auf Sauerstoffmangel (Kaluz, Kaluzová und Stanbridge, 2008). HIF-1 reguliert den Sauerstoffgehalt der Zelle, indem er für ein Gleichgewicht zwischen Bedarf und Versorgung an Sauerstoff sorgt. Der Faktor setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, HIF-1 α und HIF-1 β . Durch Hypoxie wird die Untereinheit HIF-1 α hochreguliert. Dies führt dazu, dass der HIF-1-Komplex stabilisiert wird und verschiedene Gene hochreguliert werden, um das Überleben bei Sauerstoffmangel zu sichern. HIF-1 wirkt, indem es an das HRE des Gen-Promotors bindet und dieses transaktiviert. Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass HIF eine erhöhte Expression von VEGF auslöst (Mohamed, Le, Duong, Wu, Zhang und Messadi, 2004). Im Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen ist außerdem von wesentlicher Bedeutung, dass HIF an der Angiogenese des Tumorwachstums beteiligt ist. Es ist schon länger bekannt, dass Hypoxie bei Resistenz gegenüber Chemotherapie sowie an der Umgehung der Apoptose bei Karzinomzellen beteiligt ist (Harris, 2002). Diese in dieser Arbeit ermittelte signifikant höhere Expression von HRE in Abwesenheit von TUSC3 bedeutet, dass TUSC3 durch die Hemmung des HRE die mögliche Bindung des HIF-1 an HRE verringert und damit der Tumorzelle die Möglichkeit nimmt zu wachsen.

Die Untersuchung des Reporterplasmids „PPAR-response-Element“ (PPRE) ergab ebenfalls eine Hemmung seiner Aktivität durch TUSC3. Eine Liganden-gesteuerte Aktivierung Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptoren (PPAR) sorgt dafür, dass diese an Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) binden und einen Komplex bilden. Dieser wiederum bindet an das PPRE und sorgt so für eine Induktion der

Differenzierung, des Zellzyklusarrests, der Seneszenz und der Apoptose (Michalik et al., 2006). Über diesen Prozess wird die Expression einer Vielzahl von Genen mit größtenteils anti-tumoraler Wirkung reguliert. Des Weiteren spielen PPARs eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung von Zellen und Geweben (Fett, Knochen, Makrophagen, Magendarmtrakt) und der Tumorgenese bzw. Tumorprävention (Belfiore, Genua und Malaguarnera, 2009). Durch die verminderte Aktivität von PPRE, welche durch TUSC3 induziert wird, wird auch die vielfältige Wirkung von PPAR γ auf Tumorzellen und normale Zellen verändert. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Analyse der Reporterplasmide eine signifikante Hemmung verschiedener krebsrelevanter Signalwege, die mit dem EGFR in Verbindung stehen, durch TUSC3 zeigte.

TUSC3 unterbindet eine durch Tunicamycin herbeigeführte Deglykosylierung des EGFR

In einem weiteren Versuch sollte die Funktion von TUSC3 bei der Glykosylierung geklärt werden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass es durch die Hemmung der EGFR-Glykosylierung durch Tunicamycin zu einer Änderung der EGFR-Konformation und der Phosphorylierung kommt (Fernandes et al., 2001). Außerdem löst Tunicamycin ER-Stress aus, indem es die Protein-Glykosylierung blockiert und dadurch eine ER-bezogene Apoptose einleitet (Ling et al., 2009). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TUSC3 auf diesen Prozess untersucht. Ein möglicher Einfluss auf die Tunicamycin-induzierte Glykosylierungshemmung im Allgemeinen und die Glykosylierung des EGFR wurde mittels Kurzzeitkinetik und anschließender „Western Blot“-Analyse untersucht. Dabei ergab sich, dass es durch die Tunicamycin-induzierte Hemmung zu einer erhöhten Konzentration an unglykosyliertem EGFR in den untersuchten SW480-Zellen kommt. Bei einer Überexpression von TUSC3 fiel die Konzentration an unglykosyliertem EGFR in den untersuchten SW480-Zellen signifikant ab und stieg gleichzeitig die Konzentration an glykosyliertem EGFR an. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass TUSC3 eine durch Tunicamycin herbeigeführte Deglykosylierung des EGFR unterbindet. Das bedeutet, dass TUSC3 die negative Wirkung von Tunicamycin auf die EGFR-N-Glykosylierung verhindern kann, was nahelegt, dass TUSC3 die N-Glykosylierung von EGFR im ER fördert. Die N-Glykosylierung ermöglicht den ordnungsgemäßen Transport des EGFR zum Golgi und die Einlagerung in die Plasmamembran, wo die Ligandenbindung, die Dimerisierung und die Signalinitiierung erfolgen.

Lokalisation von TUSC3 am endoplasmatischen Retikulum

Mohorko et al. (2011) legten dar, dass das hier untersuchte TUSC3-Protein, welches durch das Tumorsuppressorgen *TUSC3* kodiert wird, eine Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes

ist und dieser Komplex die N-Glykosylierung von Proteinen am endoplasmatischen Retikulum katalysiert. Somit wurde allgemein davon ausgegangen, dass auch TUSC3 am ER lokalisiert ist. Die Tatsache, dass es sich um eine Untereinheit des OST-Komplexes handelt, konnte bereits mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden (Mohorko et al., 2014). Dass TUSC3 dabei am ER lokalisiert ist, wurde für das kolorektale Karzinom bisher aber noch nicht nachgewiesen. Lediglich in Ovarialkarzinomzelllinien konnte die Lokalisation von TUSC3 bereits geklärt werden (Vaňhara et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Immunfluoreszenzfärbungen in Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt, wobei mit spezifischen Antikörpern gegen TUSC3 und Calnexin (Lektin des ER) die genaue Lokalisation des Proteins und des ERs erfolgte. Durch die Überlagerung der beiden Färbungen konnte eindeutig belegt werden, dass sich TUSC3 am ER befindet, was die Annahme einer Funktion an der N-Glykosylierung zusätzlich unterstützt.

Proliferations- und Überlebenshemmung von kolorektalen Karzinomzellen durch TUSC3

Da Proliferation und Apoptose durch die EGFR-Signalgebung reguliert werden, sollte der direkte Einfluss von TUSC3 auf diese Prozesse überprüft werden. Sowohl an Ovarialkarzinomen als auch an Prostatakarzinomen konnte gezeigt werden, dass durch ein Ausschalten von TUSC3 die Proliferation der Tumorzellen erhöht wird (Vaňhara et al., 2013, Horak et al., 2014). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TUSC3 auf die Proliferation kolorektaler Zelllinien untersucht. Anstatt TUSC3 abzuschalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert, welche Folgen eine Überexpression von TUSC3 in kolorektalen Zelllinien hat. Übereinstimmend mit Vaňhara et al. (2013) wurde auch in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss von TUSC3 auf die Proliferation der kolorektalen Karzinomzellen erkannt. Durch die Kombination von TUSC3 mit SPARC kam es allerdings zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. SPARC ist ein Glykoprotein, welches im kolorektalen Karzinom als Tumorsuppressor dient und in diesem Fall als Positivkontrolle verwendet wurde. Dies deutet darauf hin, dass SPARC durch TUSC3 beeinflusst wird und so seine Funktion als Tumorsuppressorgen effektiver ausführen kann, denn nur bei einer gleichzeitigen Überexpression der beiden Gene konnte der Effekt der Proliferationshemmung gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde neben dem Einfluss auf die Proliferation auch das Überleben der Karzinomzellen bei gleichzeitiger Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika untersucht. Dabei zeigte sich erneut eine hemmende Wirkung bei einer Kombination von SPARC und TUSC3, allerdings bewirkte SPARC hier auch ohne TUSC3 eine gesteigerte Empfindlichkeit der KRK-Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum. Eine Besonderheit war, dass ein hemmender Effekt auch ohne den Einsatz der Chemotherapeutika erkennbar war, welche den Effekt lediglich verstärkten. Zusammenfassend

brachte dieser Versuchsteil zum Ausdruck, dass TUSC3 in Verbindung mit anderen Proteinen sowohl die Proliferation als auch das Überleben bzw. die Chemoresistenz von RAS/WNT-mutierten Kolonkarzinomzelllinien hemmen kann. Damit wurde gezeigt, dass sich TUSC3 im kolorektalen Karzinom ähnlich verhält wie bei Ovarial- oder Prostatakarzinomen. Außerdem sind diese Ergebnisse ein weiteres Indiz für die mögliche Funktion von TUSC3 als Tumorsuppressorgen.

TUSC3 vermittelte Apoptose in KRK-Zellen

Die „Microarray“-Analysen deuteten außerdem darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen TUSC3 und Apoptose besteht. Auch anhand der Immunfluoreszenzfärbung wurde ein möglicher Einfluss von TUSC3 bei der Apoptose impliziert. Mittels „Western Blot“-Analyse wurde der Zusammenhang anhand des PARP-Proteins daher eingehender überprüft. Ein positiver Einfluss von TUSC3 auf die Apoptose konnte in HEK293T- und HCT116-Zellen mittels „Western Blot“-Analyse gezeigt werden. In HEK293T-Zellen war jedoch lediglich ein Trend zu beobachten, der einen fördernden Einfluss von TUSC3 auf die Apoptose vermuten lässt, ein signifikanter Zusammenhang konnte hier nicht aufgezeigt werden. In HCT116-Zellen konnte dagegen eine signifikante Erhöhung von PARP durch TUSC3 aufgezeigt werden. In SW480-Zellen konnte keinerlei Effekt von TUSC3 auf den Apoptosemarker PARP ermittelt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass SW480-Zellen eine natürliche Resistenz gegen Apoptose haben (Zhang et al., 2012). Eine Beteiligung von TUSC3 an der Apoptose ist ein weiterer Hinweis auf dessen Funktion als Tumorsuppressorgen im kolorektalen Karzinom.

Auch in anderen Tumorentitäten wurde ein Einfluss von TUSC3 auf den Zelltod festgestellt. So stellten Horak et al. (2014) beim Prostatakarzinom eine Verbindung zwischen ER-Stress und dem Verlust von TUSC3 her. Sie zeigten, dass ein Verlust von TUSC3 zu einer Reduktion des ER-Stresses führt. Dieser ER-Stress sorgt für eine Aktivierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP und damit auch des Apoptose-Signalwegs PERK/CHOP (Horak et al., 2014). Bei *PERK* (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) handelt es sich um ein Gen, welches für ein ER-residentes Protein kodiert und durch ER-Stress induziert wird. Es sorgt für die Repression der Proteinsynthese und verringert die Initiation der Translation.

Keine Korrelation zwischen dem Vorkommen von TUSC3 im Tumorgewebe und dem Ansprechen der Patienten auf eine Cetuximab-Therapie

Im letzten Schritt dieser Dissertation sollte die klinische Relevanz von TUSC3 bei Patienten untersucht werden, die bereits mit Cetuximab behandelt wurden. Cetuximab ist ein häufig verwendetes Medikament in der Antikörper-vermittelten Krebstherapie (Humblet, 2004). Es handelt sich dabei um einen gegen den EGFR gerichteten therapeutischen Antikörper. Er richtet sich gegen die auf den Tumorzellen überexprimierten EGFRs und blockiert letztere dadurch, was zur Folge hat, dass die Aktivierung des Rezeptors sowie nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden gehemmt werden. Der Erfolg einer Cetuximab-Therapie ist jedoch unter anderem von Mutationen im *KRAS*- und *NRAS*-Gen abhängig. Eine erworbene Mutation in der extrazellulären Domäne von EGFR (S492R) hebt eine Cetuximab-Bindung an den überexprimierten EGFRs auf und führt so zu einer Resistenz gegenüber einer Cetuximab-Therapie. Diese Resistenzen gegen EGFR-Therapien beruhen meist jedoch auf verschiedenen Faktoren, die miteinander interagieren (Chong und Jänne, 2013). Es wurden bereits zahlreiche Mechanismen beschrieben, die Resistenzen gegen EGFR-TKIs und monoklonale Antikörper auslösen (De Roock, De Vriendt, Normanno, Ciardiello und Tejpar, 2011). Dazu zählen neben der Aktivierung von *KRAS* der Verlust von *PTEN* und die Aktivierung von *PIK3CA* und *BRAF*. Dies führt zu einer anhaltenden Aktivierung der nachgeschalteten Signale trotz EGFR-Hemmung und damit zu einer Hemmung der Apoptose und Steigerung der zellulären Proliferation (Laurent-Puig et al., 2009).

Um den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von TUSC3 in der kolorektalen Tumorzelle und dem Ansprechen der Patienten auf eine Cetuximab-Therapie zu überprüfen, wurde eine vergleichende immunhistochemische Analyse von Cetuximab „non-Respondern“ und „Respondern“ hinsichtlich des Vorkommens von TUSC3 in Tumoren von KRK-Patienten vorgenommen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte bisher keine eindeutige Korrelation zwischen dem Vorkommen von TUSC3 im Tumorgewebe und dem Ansprechen der Patienten auf eine Cetuximab-Therapie nachgewiesen werden. Nur bei fünf von elf untersuchten Patienten, die eine Reaktion auf Cetuximab zeigten, konnte eine TUSC3-Expression im Tumorgewebe festgestellt werden. Allerdings war die Anzahl der verwendeten Patientenproben sehr gering und daher ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses vergleichsweise gering und eine Korrelation konnte nicht hergestellt werden. Eine umfangreichere Prüfung dieser Frage sollte das Ziel zukünftiger, weiterführender Studien sein. In diesem Rahmen wäre es insbesondere interessant zu prüfen, inwiefern TUSC3 humane KRK-Zelllinien gegen Cetuximab resensibilisiert.

Abschließend ist festzuhalten: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Tumorentitäten (Vaňhara et al., 2013) nachgewiesen werden, dass TUSC3 im kolorektalen Karzinom am ER lokalisiert ist. So konnte ebenfalls bestätigt werden, dass TUSC3 im kolorektalen Karzinom, wie in anderen Tumorzelltypen, durch eine Hypermethylierung reguliert wird, indem die mRNA Expression gesenkt wird und damit verbunden auch die Proteinexpression von TUSC3. Als exemplarisches Zielprotein von TUSC3 konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals der EGFR identifiziert werden. Dieser Zusammenhang konnte bislang in keiner anderen Tumorentität nachgewiesen werden. Im Rahmen der Dissertation konnte gezeigt werden, dass TUSC3 die Aktivität von phosphoryliertem EGFR hemmt und die Akkumulation von nukleärem EGFR unterbindet. Außerdem wurde festgestellt, dass TUSC3 weiter stromabwärts des RAS/RAF/MEK/ERK- und des PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Weges auch die Expression von p-AKT und p-ERK1/2 verringert, die in der Karzinomzelle die Proliferation fördern und die Apoptose verhindern. Diese Hemmung der Proliferation und der Chemoresistenz konnte anhand von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien auch mittels MTT-Test belegt werden. Eine zusätzliche Validierung erfolgte anhand der „Microarray“-Analyse, die ebenfalls einen Einfluss von TUSC3 auf Gene der N-Glykosylierung und der Apoptose aufwies. Auf die EGFR-Degradation und die Präsenz an der Plasmamembran zeigte TUSC3 bei den vorgenommenen Untersuchungen ebenso wenig Einfluss wie auf die Transferrinrezeptor-Kontrolle. TUSC3 scheint somit eine apoptotische Funktion im ER auszuüben, wobei das Tumorwachstum gehemmt wird und TUSC3 eine Schutzfunktion im kolorektalen Karzinom einnimmt. Diese scheint allerdings unter bestimmten Umständen in einem frühen Stadium der Karzinogenese verloren zu gehen. Dies könnte zur Folge haben, dass es im späteren Verlauf der Tumorprogression zu einer Chemoresistenz im kolorektalen Karzinom kommt. Die Untersuchung der Reporterplasmide ergab, dass TUSC3 vielfältige Tumor-relevante Signalwege hemmt, allen voran den *WNT*-Weg. Die in dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar mit den bereits angesprochenen Ergebnissen in anderen Tumorentitäten. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Gu et al. (2016) steht jedoch im Widerspruch zu den Resultaten aller vorhergehender Arbeiten anderer Forschergruppen zu diesem Thema, eingeschlossen der hier erhobenen Daten. In dieser Veröffentlichung wurde belegt, dass im Tumorgewebe mehr TUSC3-Protein vorhanden ist als im Normalgewebe. Außerdem wurde festgestellt, dass es in Abwesenheit von TUSC3 zu einer verminderten Proliferation der Kolonkarzinomzellen kommt und dass ein Herunterregulieren von TUSC3 zu einer signifikant niedrigeren Phosphorylierung von AKT und ERK führt (Gu et al., 2016). In Anbetracht derart unterschiedlicher Ergebnisse scheint es erforderlich die exakten molekularen Mechanismen der von TUSC3-vermittelten N-Glykosylierung seiner Zielproteine in weiterführenden Experimenten noch genauer aufzuklären.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stellt TUSC3 einen möglichen Biomarker für die Frühdiagnose des kolorektalen Adenoms dar. Des Weiteren könnte TUSC3 als Grundlage zum Verlaufsmonitoring einer Resistenz gegen Chemotherapie bzw. EGFR-Antikörper-Therapie im kolorektalen Karzinom dienen.

5. Ausblick

Als exemplarisches Zielprotein von TUSC3 konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals der EGFR identifiziert werden. Dieser Zusammenhang konnte bislang in keiner anderen Tumorentität nachgewiesen werden. Im Rahmen der Dissertation konnte gezeigt werden, dass TUSC3 die Aktivität von phosphoryliertem EGFR sowie der nachgeschalteten Signalwege hemmt und die Akkumulation von nukleärem EGFR unterbindet. Diese Arbeit erbrachte somit erste Erkenntnisse hinsichtlich einer möglichen Verwendung von TUSC3 als Tumormarker. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte die weitere Vorgehensweise in erster Linie sein, die erhaltenen Ergebnisse und Einflüsse von TUSC3 in Bezug auf den p-EGFR und die nachgeschalteten Signalwege zu festigen. Im Speziellen sollte durch mikroskopische Analysen der Zelle gezeigt werden, mit Hilfe welcher molekularen Mechanismen der EGFR in den Kern transportiert wird, da dies möglicherweise eine weitere wichtige Erkenntnis zur Funktionsweise von TUSC3 erbringen und neue Ansatzmöglichkeiten eröffnen könnte. Dies sollte vorzugsweise über Immunfluoreszenzfärbung von Kolonkarzinomzellen mit einem entsprechenden EGFR- bzw. p-EGFR-Antikörper erfolgen. Außerdem müssten zukünftige Experimente klären, ob TUSC3 andere Mitglieder der ERBB-Rezeptorfamilie betrifft oder spezifisch für den EGFR ist, da die Spezifität gerade in Bezug auf Tumormarker von besonderer Bedeutung ist. Weiter sollte auch die immunhistochemische Analyse von Geweben der Patienten, die bereits mit Cetuximab behandelt wurden, in einer umfassenderen Kohorte weitergeführt werden. Damit sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichende Anzahl an Patienten untersucht wird, um so ein statistisch robusteres Ergebnis zum Vorkommen von TUSC3 im Gewebe von KRK-Patienten zu erhalten. Der besondere Fokus sollte dabei auf der klinischen Therapieantwort der Patienten auf eine Behandlung mit Cetuximab liegen. Mit diesem translationalen Ansatz könnte TUSC3 als neuer Biomarker und potentielle Zielstruktur neuartiger Therapien in der Zukunft entwickelt werden.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg (UMM) durchgeführt und durch die Landesregierung Baden-Württemberg und des Zentrums für Geriatrische Onkologie und Biologie in der Metropolregion Rhein Neckar (Zobel) gefördert.

Nachfolgend soll hier allen Personen ein großer Dank ausgesprochen werden, die mich während dieser Zeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ebert dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Forschung für meine Doktorarbeit im Labor der II. Medizinischen Klinik am Uniklinikum Mannheim durchzuführen. Herrn Prof. Dr. Boutros, der als Erstgutachter für diese Arbeit fungiert, sowie Herrn Prof. Dr. Sleeman, der als Zweitgutachter für diese Dissertation tätig ist, danke ich ebenfalls recht herzlich. Dankend erwähnt sei auch Herr Prof. Dr. Hammes, an dessen Doktorandenprogramm ich teilnehmen durfte.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Elke Burgermeister, meiner wissenschaftlichen Betreuerin und AG-Leiterin im Forschungslabor der II. Med. Klinik. Ich danke Dir für den Entwurf und die Entwicklung des TUSC3-Forschungskonzeptes sowie des experimentellen Ablaufes der Dissertation und auch für die inhaltlichen Korrekturen der vorliegenden Dissertation. Zudem sei hier auch allen Kollegen im Labor gedankt, Michaela, Isabel, Frank, Sandra, Tobias, Wen und Philip. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung. Es hat super viel Spaß gemacht mit euch allen zu arbeiten.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Carsten Sticht vom ZMF für die Durchführung und die Auswertung des „Microarray“ und Herrn Dr. Daniel Nowak sowie Herrn Max Mossner für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung des Next Generation Sequencing.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Patienten, die mit ihren Gewebeproben dafür gesorgt haben, dass verschiedene Versuche dieser Arbeit durchgeführt werden konnten.

Weiterer Dank gilt auch Steffi und Micha für das Revanche-Korrekturlesen der kompletten Arbeit. Sowie meiner Oma und meinem Opa, die mich unterstützt und mit leckerem Essen bei Laune gehalten haben. Außerdem danke ich Ortraud und Erich, die mir dankenswerterweise ein Fahrrad zur Verfügung gestellt haben, das mich bei Wind und Wetter vom Bahnhof bis zur Klinik gebracht hat.

Zu guter Letzt gilt natürlich der größte Dank meinen Eltern, die mich nicht nur bei dieser Doktorarbeit, sondern mein ganzes Leben lang immer wunderbar unterstützt haben, mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Vielen, vielen Dank. Ihr seid die Allerbesten.

Literaturverzeichnis

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ (1995), Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *International Journal of Cancer*. 1995; 64(6):430-3.

Abe M, Kuroda Y, Hirose M, Watanabe Y, Nakano M, Handa T (2006), Inhibition of autophosphorylation of epidermal growth factor receptor by small peptides in vitro. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 147(4):402-11.

Aebi M (2013), N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833(11):2430-7. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.

Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP (1998), Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Research* 1998; 58(23):5489-94.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011), *Molekularbiologie der Zelle*. John Wiley & Sons, 5. Auflage, 2011 - 1928 Seiten.

Alexander J, Bey E, Whitcutt JM, Gear JH (1976), Adaptation of cells derived from human malignant tumours to growth in vitro. *South African Journal of Medical Sciences*. 1976; 41(2):89-98.

Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH (1995), Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*. 1995; 10(9):1813-21.

Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL (2009), American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(12):2091-6. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9170.

Althumairi AA, Gearhart SL (2015), Local excision for early rectal cancer: transanal endoscopic microsurgery and beyond. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2015; 6(3):296-306. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.022.

Arbieva ZH, Banerjee K, Kim SY, Edassery SL, Maniatis VS, Horrigan SK, Westbrook CA (2000), High-resolution physical map and transcript identification of a prostate cancer deletion interval on 8p22. *Genome Research*. 2000; 10(2):244-57.

Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR (2005), Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*. 2005; 104(10):2035-47.

Aschele C, Bergamo F, Lonardi S (2009), Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2009; 35(6):509-16. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.04.003.

Barolo S (2006), Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? *Oncogene*. 2006; 25(57):7505-11.

Baselga J, Hammond LA (2002), HER-targeted tyrosine-kinase inhibitors. *Oncology*. 2002; 63(1):6-16.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998), Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in Cancer Research*. 1998; 72:141-96.

Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R (2009), PPAR- γ agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. *PPAR Research*. 2009; 2009:830501. doi: 10.1155/2009/830501.

Belshaw NJ, Elliott GO, Foxall RJ, Dainty JR, Pal N, Coupe A, Garg D, Bradburn DM, Mathers JC, Johnson IT (2008), Profiling CpG island field methylation in both morphologically normal and neoplastic human colonic mucosa. *British Journal of Cancer*. 2008; 99(1):136-42. doi: 10.1038/sj.bjc.6604432.

Bertario L, Russo A, Sala P, Eboli M, Radice P, Presciuttini S, Andreola S, Rodriguez-Bigas MA, Pizzetti P, Spinelli P (1999), Survival of patients with hereditary colorectal cancer: comparison of HNPCC and colorectal cancer in FAP patients with sporadic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 1999; 80(2):183-7.

Böhm H-J, Klebe G, Kubinyi H (2002), Wirkstoffdesign: der Weg zum Arzneimittel. Spektrum Akademischer Verlag, 2002 - 599 Seiten.

Boland CR, Goel A (2010), Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2073-2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003), A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.

Bonjer HJ, Deijen CL, Haglund E; COLOR II Study Group (2015), A randomized trial of laparoscopic versus open surgery for rectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015; 373(2):194. doi: 10.1056/NEJMc1505367.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P (2008), Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008; 300(23):2765-78. doi: 10.1001/jama.2008.839.

Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB (1996), Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics*. 1996; 35(1):46-54.

Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011), The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discovery Medicine*. 2011; 12(66):419-32.

Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014), Colorectal cancer. *Lancet*. 2014; 383:1490-502.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2016), The TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition. ISBN: 978-1-119-26357-9; 272 pages; 2016, Wiley-Blackwell

Büttner R, Thomas C (2003), Allgemeine Pathologie. Schattauer Verlag, 3. Auflage, 2003 - 299 Seiten.

Busch U (2010), Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag, 2010 - 317 Seiten.

Burgermeister E, Höde P, Betge J, Tänzer M, Mossner M, Nowak D, Magdeburg J, Rückert F, Sticht C, Breitkopf-Heinlein K, Schulte N, Härtel N, Post S, Ingold-Heppner B, Röcken C, Ebert M (2017), Loss of TUSC3 contributes to progression of early colorectal cancer via activation of epidermal growth factor signaling. Unpubliziert

Cao H, Lei ZM, Bian L, Rao CV (1995), Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma JEG-3 cells and normal human placenta. *Endocrinology*. 1995; 136(7):3163-72.

Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, Brunet R, Butts C, Conroy T, Debraud F, Figer A, Grossmann J, Sawada N, Schöffski P, Sobrero A, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E (2004), XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22(11):2084-91.

Centelles JJ (2012), General aspects of colorectal cancer. *International Scholarly Research Notices Oncology*. 2012; 2012:139268. doi: 10.5402/2012/139268.

Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E (2009), Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2009; 59:366–378.

Chan AT, Giovannucci EL (2010), Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2029-2043.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.057.

Chao DT, Korsmeyer SJ (1998), BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Reviews of Immunology*. 1998; 16:395-419.

Cherepanova NA, Gilmore R (2016), Mammalian cells lacking either the cotranslational or posttranslocational oligosaccharyltransferase complex display substrate-dependent defects in asparagine linked glycosylation. *Scientific Reports*. 2016; 6:20946. doi: 10.1038/srep20946.

Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995), Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 1995; 374(6524):733-6.

Chong CR, Jänne PA (2013), The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Medicine*. 2013; 19(11):1389-400. doi: 10.1038/nm.3388.

Citri A, Yarden Y (2006), EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2006; 7(7):505-16.

Clark D, Pazdernik N (2009), *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009 - 707 Seiten.

Cooke SL, Pole JC, Chin SF, Ellis IO, Caldas C, Edwards PA (2008), High-resolution array CGH clarifies events occurring on 8p in carcinogenesis. *BioMed Central Cancer*. 2008; 8:288. doi: 10.1186/1471-2407-8-288.

Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A (2002), 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(41):38965-71.

Coussens LM, Werb Z (2002), Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860-7.

Cox B, Emili A. (2006), Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature Protocols*. 2006; 1(4):1872-8.

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N (2010), Colorectal cancer. *Lancet*. 2010; 375(9719):1030-47. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4.

Davies RJ, Miller R, Coleman N. (2005), Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5(3):199-209. Abgerufen am 23.06.16 von <http://syscol-project.eu/about-syscol/>

De Angelis Campos AC, Rodrigues MA, de Andrade C, de Goes AM, Nathanson MH, Gomes DA (2011), Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2011; 412(2):341-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100.

Denoix PF (1946), Enquête permanent dans les centres anticancereux. *Bulletin. Institut National D'Hygiene*. 1946; 1:70-75.

De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S (2011), KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*. 2011; 12(6):594-603. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70209-6.

Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlbach R, Rodemann HP (2005), Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(35):31182-9.

Dutra FF, Bozza MT (2014), Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 2014; 5:115. doi: 10.3389/fphar.2014.00115.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF (2001), The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48(4):526-35.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW (2000), MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(8):e32.

Fan X, Zhang X, Shen J, Zhao H, Yu X, Chen Y, Zhuang Z, Deng X, Feng H, Wang Y, Peng L (2016), Decreased TUSC3 promotes pancreatic cancer proliferation, invasion and metastasis. *Public Library of Science One*. 2016; 11(2):e0149028. doi: 10.1371/journal.pone.0149028.

Fassbender A, Lewin J, König T, Rujan T, Pelet C, Lesche R, Distler J, Schuster M (2010), Quantitative DNA methylation profiling on a high-density oligonucleotide microarray. *Methods in Molecular Biology*. 2010; 576:155-70. doi: 10.1007/978-1-59745-545-9_9.

Fearon ER, Vogelstein B (1990), A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5):759-67.

Fernandes H, Cohen S, Bishayee S (2001), Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRVIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(7):5375-83.

Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P (2013), Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; 5(3):a013169. doi: 10.1101/cshperspect.a013169.

Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW (2008), A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *American Journal of Human Genetics*. 2008; 82(5):1158-64. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.03.018.

Giovannucci E (2001), An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001; 10(7):725-31.

Gollins S (2010), Radiation, chemotherapy and biological therapy in the curative treatment of locally advanced rectal cancer. *Colorectal Disease*. 2010; 12(2):2-24. doi: 10.1111/j.1463-1318.2010.02320.x.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999), Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999; 286(5439):531-7.

Graw J (2015), *Genetik*. Springer Berlin Heidelberg, 6. Auflage, 2015 - 800 Seiten.

Grothey A, Allegra C (2012), Antiangiogenesis therapy in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2012; 4(6):301-19. doi: 10.1177/1758834012454464.

Gu Y, Wang Q, Guo K, Qin W, Liao W, Wang S, Ding Y, Lin J (2016), TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/ β -catenin and MAPK signalling. *Journal of Pathology*. 2016; 239(1):60-71. doi: 10.1002/path.4697.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S (2015), The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015; 21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.

Guo HB, Johnson H, Randolph M, Lee I, Pierce M (2009), Knockdown of GnT-Va expression inhibits ligand-induced downregulation of the epidermal growth factor receptor and intracellular signaling by inhibiting receptor endocytosis. *Glycobiology*. 2009; 19(5):547-59. doi: 10.1093/glycob/cwp023.

Haggar FA, Boushey RP (2009), Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2009; 22(4): 191–197

Hallbach J (2006), *Klinische Chemie für den Einstieg*. Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, 2006 - 495 Seiten.

Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1999), Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1999; 18(17):2681-9.

Harris AL (2002), Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(1):38-47.

Heald RJ, Ryall RD (1986), Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986; 1(8496):1479-82.

Herbst RS, Bunn PA Jr (2003), Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9(16 Pt 1):5813-24.

Holinski-Feder E, Grabowski M (2006), Erbliches nicht polypöses kolorektales Karzinom – HNPCC. *Daten des HNPCC-Konsortiums der Deutschen Krebshilfe*, medgen 18, Heft 3, 2006, S. 246-253.

Horak P, Tomasich E, Vaňhara P, Kratochvílová K, Anees M, Marhold M, Lemberger CE, Gerschpacher M, Horvat R, Sibilia M, Pils D, Krainer M (2014), TUSC3 loss alters the ER stress response and accelerates prostate cancer growth in vivo. *Scientific Reports*. 2014; 4:3739. doi: 10.1038/srep03739.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds) (2016), SEER Cancer statistics review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, Abgerufen am 13.05.16 von http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

Hu T, Li C (2010), Convergence between Wnt- β -catenin and EGFR signaling in cancer. *Molecular Cancer*. 2010; 9:236. doi: 10.1186/1476-4598-9-236.

Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraborty K, Simon J, Bard M, Friend SH (2000), Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*. 2000; 102(1):109-26.

Hughes D, Mehmet H (2003), *Cell Proliferation and Apoptosis*. Garland Science. 2003 - 392 Seiten.

Humblet Y (2004), Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2004; 5(7):162

Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M (2010), Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2010; 54(8):1182-91. doi: 10.1002/mnfr.200900348.

Jaganathan S, Yue P, Paladino DC, Bogdanovic J, Huo Q, Turkson J (2011), A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *Public Library of Science One*. 2011; 6(5):e19605. doi: 10.1371/journal.pone.0019605.

Jansohn M, Rothhämel S (2012), *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Springer-Verlag, 5. Auflage, 2012 - 656 Seiten.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010), Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2044-58. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.

Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L (2012), Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012; 10(6):639-45. doi: 10.1016/j.cgh.2012.01.010.

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ (2007), Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357(20):2040-8.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003), Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*. 2003; 284(1):31-53.

Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM (2002), Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *European Journal of Cancer*. 2002; 38(8):1133-40.

Kabat GC, Miller AB, Jain M, Rohan TE (2007), A cohort study of dietary iron and heme iron intake and risk of colorectal cancer in women. *British Journal of Cancer*. 2007; 97(1):118-22.

Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ (2008), Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clinica Chimica Acta*. 2008; 395(1-2):6-13. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.002.

Kamio T, Shigematsu K, Sou H, Kawai K, Tsuchiyama H (1990), Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. *Human Pathology*. 1990; 21(3):277-82.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au H-J, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR (2008), *K-ras* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359:1757-1765. doi: 10.1056/NEJMoa0804385.

Kelleher DJ, Gilmore R (2006), An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*. 2006; 16(4):47R-62R.

Kim MS, Lee J, Sidransky D (2010/1), DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 2010; 29(1):181-206. doi: 10.1007/s10555-010-9207-6.

Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, Solca F, Choi SY, Cho BC (2010/2), Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. *Cancer Letters*. 2010; 296(2):150-9. doi:10.1016/j.canlet.2010.04.006.

Kim TM, Park PJ (2015), A genome-wide view of microsatellite instability: old stories of cancer mutations revisited with new sequencing technologies. *Cancer Research*. 2015; 74(22):6377-82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1225.

Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, Lessard L, Gleave M, Bégin LR, Mes-Masson AM, Saad F (2006), Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(9):2730-7.

Kratochvílová K, Horak P, Ešner M, Souček K, Pils D, Anees M, Tomasich E, Dráfi F, Jurtíková V, Hampl A, Krainer M, Vaňhara P (2015), Tumor suppressor candidate 3 (TUSC3) prevents the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits tumor growth by modulating the endoplasmic reticulum stress response in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2015; 137(6):1330-40. doi: 10.1002/ijc.29502.

Kudo S (1993), Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy*. 1993; 25(7):455-61.

Lau KS, Dennis JW (2008), N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology*. 2008; 18(10):750-60. doi: 10.1093/glycob/cwn071.

Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouché O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F (2009), Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(35):5924-30. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6796.

Lee HH, Wang YN, Hung MC (2015), Non-canonical signaling mode of the epidermal growth factor receptor family. *American Journal of Cancer Research*. 2015; 5(10):2944-58.

Lerebours F, Olschwang S, Thuille B, Schmitz A, Fouchet P, Buecher B, Martinet N, Galateau F, Thomas G (1999), Fine deletion mapping of chromosome 8p in non-small-cell lung carcinoma. *International Journal of Cancer*. 1999; 81(6):854-8.

Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL (2009), Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*. 2009; 28(43):3801-13. doi: 10.1038/onc.2009.234.

Liang PS, Chen TY, Giovannucci E (2009), Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 2009; 124(10):2406-15. doi: 10.1002/ijc.24191.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006), KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Research*. 2006; 66(8):3992-5.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001), Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology*. 2001; 3(9):802-8.

Ling YH, Li T, Perez-Soler R, Haigentz M Jr. (2009), Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2009; 64(3):539-48. doi: 10.1007/s00280-008-0902-8.

Lipponen P, Eskelinen M (1994), Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *British Journal of Cancer*. 1994; 69(6):1120-5.

Lo HW (2010), Nuclear Mode of the EGFR Signaling Network: Biology, Prognostic Value, and Therapeutic Implications. *Discov Med*. 2010; 10(50):44-51.

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC (2005/1), Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*. 2005; 7(6):575-89.

Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC (2005/2), Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Research*. 2005; 65(1):338-48.

Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC (2006), Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 98(6):1570-83.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP (2003), Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2003; 100(3):776-81.

Logan CY, Nusse R (2004), The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Development Biology*. 2004; 20:781-810.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003), 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(5):330-8.

Lynch HT, Smyrk T (1996), Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996; 78(6):1149-67.

Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H (2013), Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *Public Library of Science One*. 2013; 8(1):e53916. doi: 10.1371/journal.pone.0053916.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009), Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Development Cell*. 2009; 17(1):9-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.

MacGrogan D, Levy A, Bova GS, Isaacs WB, Bookstein R (1996), Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22. *Genomics*. 1996; 35(1):55-65.

Mahmood T, Yang PC (2012), Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012; 4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998.

Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J (2010), EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Advances in Clinical Chemistry*. 2010; 51:71-119.

Marti U, Burwen SJ, Wells A, Barker ME, Huling S, Feren AM, Jones AL (1991), Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology*. 1991; 13(1):15-20.

Marti U, Ruchti C, Kämpf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, Gerber H, Bürgi U (2001), Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid*. 2001; 11(2):137-45.

Mathijssen RH, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A (2002), Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Current Cancer Drug Targets*. 2002; 2(2):103-23.

Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, Lasham A, Blenkiron C, Laking G, Print C (2010), Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2010; 2(2):125-48. doi: 10.1177/1758834009360519.

Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006), International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological Reviews*. 2006; 58(4):726-41.

Minsky BD (2010), Chemoradiation for rectal cancer: rationale, approaches, and controversies. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2010; 19(4):803-18. doi: 10.1016/j.soc.2010.06.001.

Mitsui K, Yonezawa M, Tatsuguchi A, Shinji S, Gudis K, Tanaka S, Fujimori S, Sakamoto C (2014), Localization of phosphorylated ErbB1-4 and heregulin in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14:863. doi: 10.1186/1471-2407-14-863.

Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV (2004), Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*. 2004; 76(2):143-52.

Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M (2011), Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2011; 34(4):869-78. doi: 10.1007/s10545-011-9337-1.

Mohorko E, Owen RL, Malojčić G, Brozzo MS, Aebi M, Glockshuber R (2014), Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Structure*. 2014; 22(4):590-601. doi: 10.1016/j.str.2014.02.013.

Monteiro MB, Thieme K, Santos-Bezerra DP, Queiroz MS, Woronik V, Passarelli M, Machado UF, Giannella-Neto D, Oliveira-Souza M, Corrêa-Giannella ML (2016), Beta-2-microglobulin (B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes. *Metabolism*. 2016 Jun; 65(6):816-24. doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.012.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997), Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997; 275(5307):1787-90.

Mosmann T (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986; 51(Pt 1):263-73.

Murken J (2006), *Humangenetik*. Georg Thieme Verlag, 7. Auflage, 2006 - 598 Seiten.

Musgrove EA (2004), Wnt signalling via the epidermal growth factor receptor: a role in breast cancer? *Breast Cancer Research*. 2004; 6(2):65-8.

Nishikawa A, Ihara Y, Hatakeyama M, Kangawa K, Taniguchi N (1992), Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine: beta-D-mannoside beta-1,4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(25):18199-204.

Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F (2009), Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2009; 6(9):519-27. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.111.

O`Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004), Colon cancer survival rates with the new american joint committee on cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; 96 (19): 1420-1425. doi: 10.1093/jnci/djh275

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005), A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*. 2005; 1:2005.0010.

Ogino S, Goel A (2008), Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2008; 10(1):13-27. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070082.

Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994), Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 1994; 263(5153):1625-9.

Park PJ, Cao YA, Lee SY, Kim JW, Chang MS, Hart R, Choi S (2004), Current issues for DNA microarrays: platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference. *Journal of Biotechnology*. 2004; 112(3):225-45.

Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA (2004), Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Disease Markers*. 2004; 20(4-5):199-206.

Peinado M, Fernandezrenart M, Capella G, Wilson L, Perucho M (1993), Mutations in the p53 suppressor gene do not correlate with C-k-ras oncogene mutations in colorectal-cancer. *International Journal of Oncology*. 1993; 2(2):123-34.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000), Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797): 47-52.

Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinthaller A, Zeillinger R, Krainer M (2005), Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer*. 2005; 104(11):2417-29.

Pils D, Horak P, Vaňhara P, Anees M, Petz M, Alfanz A, Gugereil A, Wittinger M, Gleiss A, Auner V, Tong D, Zeillinger R, Braicu EI, Sehouli J, Krainer M (2013), Methylation status of TUSC3 is a prognostic factor in ovarian cancer. *Cancer*. 2013; 119(5):946-54. doi: 10.1002/cncr.27850.

Pinho SS, Reis CA (2015), Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*. 2015; 15(9):540-55. doi: 10.1038/nrc3982.

Platell C (2011), Colorectal cancer survival. *ANZ Journal of Surgery*. 2011; 81(5):310–311. doi: 10.1111/j.1445-2197.2011.05706.x.

Pöschl G, Seitz HK (2004), Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism*. 2004; 39(3):155-65.

Pownall S, Kozak CA, Schappert K, Sarkar M, Hull E, Schachter H, Marth JD (1992), Molecular cloning and characterization of the mouse UDP-N-acetylglucosamine:alpha-3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene. *Genomics*. 1992; 12(4):699-704.

Prinz C (2012), Basiswissen Innere Medizin. Springer Verlag, 29.08.2012 - 402 Seiten.

Psyrr A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA (2005), Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11(16):5856-62.

Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. (2010), TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2010; 134:837-52.

Quirke P, Cuvelier C, Ensari A, Glimelius B, Laurberg S, Ortiz H, Piard F, Punt CJ, Glenthoj A, Pennickx F, Seymour M, Valentini V, Williams G, Nagtegaal ID (2010), Evidence-based medicine: the time has come to set standards for staging. *Journal of Pathology*. 2010; 221:357-60.

Reid A, Vidal L, Shaw H, de Bono J (2007), Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *European Journal of Cancer*. 2007; 43(3):481-9.

Reinard T (2010), Molekularbiologische Methoden, Verlag Eugen Ulmer, 1. Auflage, 2010 - 220 Seiten.

Renz H (2014), *Praktische Labordiagnostik: Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2. Auflage, 2014 - 622 Seiten.

Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). (2012), *Krebs in Deutschland 2011/2012*. BGZ Druckzentrum GmbH (Berlin), 10. Auflage, 2012 – 156 Seiten. doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.

Ruiz-Tovar J, Jiménez-Miramón J, Valle A, Limones M (2010), Endoscopic resection as unique treatment for early colorectal cancer. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2010; 102(7):435-41.

Sanger F, Coulson AR (1975), A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975; 94(3):441-8.

Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE (2008), Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*. 2008; 60(2):131-44. doi: 10.1080/01635580701684872.

Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR (2004), The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10(12 Pt 2):4227-4232.

Schachter H (1986), Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochemistry and Cell Biology*. 1986; 64(3):163-81.

Schulz BL, Stirnimann CU, Grimshaw JP, Brozzo MS, Fritsch F, Mohorko E, Capitani G, Glockshuber R, Grütter MG, Aebi M (2009), Oxidoreductase activity of oligosaccharyltransferase subunits Ost3p and Ost6p defines site-specific glycosylation efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009; 106(27):11061-6. doi: 10.1073/pnas.0812515106.

Sharma S (2009), Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2009; 30(1): 1–8. doi: 10.4103/0971-5851.56328.

Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP (2007), Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*. 2007; 104(47):18654-9.

Shrimal S, Ng BG, Losfeld ME, Gilmore R, Freeze HH (2013), Mutations in STT3A and STT3B cause two congenital disorders of glycosylation. *Human Molecular Genetics*. 2013 Nov; 22(22):4638-45. doi: 10.1093/hmg/ddt312.

Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015), Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015; 41:71-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.005.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E (2012), Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA a Cancer Journal for Clinicians*. 2012; 62(4):220-41. doi: 10.3322/caac.21149.

Siegenthaler W (2006), *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, 9. Auflage, 2006 - 1232 Seiten.

Singh AB, Harris RC (2005), Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. 2005; 17(10):1183-93.

Soulières D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, Tsao MS, Kamel-Reid S (2010), KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Current Oncology* 2010; 17(1):31-40.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA (2011), Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*. 2011; 3(3):192-222.

Stoffel EM (2010), Lynch Syndrome/Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC). *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*. 2010; 56(1):45-53.

Stowell SR, Ju T, Cummings RD (2015), Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology*. 2015; 10:473-510. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438.

Stroop CJ, Weber W, Gerwig GJ, Nimtz M, Kamerling JP, Vliegenthart JF (2000), Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology*. 2000; 10(9):901-17.

Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR (2008), Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14(9):2560-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1802.

Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G (2010), The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2010; 107(43): 760–66. doi: 10.3238/arztebl.2010.0760

Tänzer M (2012), Novel epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and response prediction in colorectal cancer.

Abgerufen am 18.08.16 von <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20110109-1078657-1-7>

Tariq K, Ghias K (2016), Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biology & Medicine*. 2016; 13(1):120-35. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.

Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA (2010), Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology*. 2010; 138(3):877-85. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.044.

Thorstensen L, Lind GE, Løvig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA (2005), Genetic and Epigenetic Changes of Components Affecting the WNT Pathway in Colorectal Carcinomas Stratified by Microsatellite Instability. *Neoplasia*. 2005; 7(2): 99–108. doi: 10.1593/neo.04448

Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A (2004), FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22(2):229-37.

Traynor AM, Weigel TL, Oettel KR, Yang DT, Zhang C, Kim K, Salgia R, Iida M, Brand TM, Hoang T, Campbell TC, Hernan HR, Wheeler DL (2013), Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013; 81(1):138-41. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.020.

UICC (Sobin LH, Wittekind CH) (2002), TNM Classification of malignant tumours, Wiley-Liss, 6th ed., 2002.

Ullman TA, Itzkowitz SH (2011), Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011; 140(6):1807-16. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.057.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. (1984), Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*. 1984; 309(5967):418-25.

van Eijk R, Licht J, Schrupf M, Talebian Yazdi M, Ruano D, Forte GI, Nederlof PM, Veselic M, Rabe KF, Annema JT, Smit V, Morreau H, van Wezel T (2011), Rapid KRAS, EGFR, BRAF and PIK3CA mutation analysis of fine needle aspirates from non-small-cell lung cancer using allele-specific qPCR. *Public Library of Science One*. 2011; 6(3):e17791. doi: 10.1371/journal.pone.0017791.

van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM, Putter H, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van de Velde CJ; Dutch Colorectal Cancer Group (2011), Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncology*. 2011; 12(6):575-82. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70097-3.

Vañhara P, Horak P, Pils D, Anees M, Petz M, Gregor W, Zeillinger R, Krainer M (2013), Loss of the oligosaccharyl transferase subunit TUSC3 promotes proliferation and migration of ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 42(4):1383-9. doi: 10.3892/ijo.2013.1824.

van Loon K, Venook AP (2011), Adjuvant treatment of colon cancer: what is next? *Current Opinion in Oncology*. 2011; 23(4):403-9. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283479c83.

Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppi JM, Rak J, Kerbel RS (2001), Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Research*. 2001; 61(13):5090-101.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988), Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*. 1988; 319(9):525-32.

Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR (2001), DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*. 2001; 234(1):10-20.

Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC, McIntush EW, Li LY, Hawke DH, Kobayashi R, Hung MC (2006), Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nature Cell Biology*. 2006; 8(12):1359-68.

Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, Lee HJ, Lee HH, Hung MC (2010), COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2010; 399(4):498-504. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096.

Wells A (1999), EGF receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1999; 31(6):637-43.

Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, Harari PM (2008), Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*. 2008; 27(28):3944-56. doi: 10.1038/onc.2008.19.

WHO (2014), World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. 630 Seiten

Wink M (2011), *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen*. Wiley-VCH, 2. Auflage, 2011 - 688 Seiten.

Wong SF (2005), Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clinical Therapeutics*. 2005; 27(6):684-94.

Worthley DL, Leggett BA (2010), Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2010; 31(2):31-8.

Xia W, Wei Y, Du Y, Liu J, Chang B, Yu YL, Huo LF, Miller S, Hung MC (2009), Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 2009; 48(7):610-7. doi: 10.1002/mc.20504.

Yarden Y (2001), The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*. 2001; 37 Suppl 4:S3-8.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001), Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2001; 2(2):127-37.

Yi JM, Dhir M, Guzzetta AA, Iacobuzio-Donahue CA, Heo K, Yang KM, Suzuki H, Toyota M, Kim HM, Ahuja N (2012), DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. *Tumour Biology*. 2012; 33(2):363-72. doi: 10.1007/s13277-011-0302-2.

Zhang Y, Yuan J, Zhang HY, Simayi D, Li PD, Wang YH, Li F, Zhang WJ (2012), Natural resistance to apoptosis correlates with resistance to chemotherapy in colorectal cancer cells. *Clinical and Experimental Medicine*. 2012; 12(2):97-103. doi: 10.1007/s10238-011-0146-5.

Zhen Y, Caprioli RM, Staros JV (2003), Characterization of Glycosylation Sites of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Biochemistry*. 2003; 42(18): 5478–5492. doi: 10.1021/bi027101p

Zhou H, Clapham DE (2009), Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2009; 106(37):15750-5.

Anhang

Abbildungen

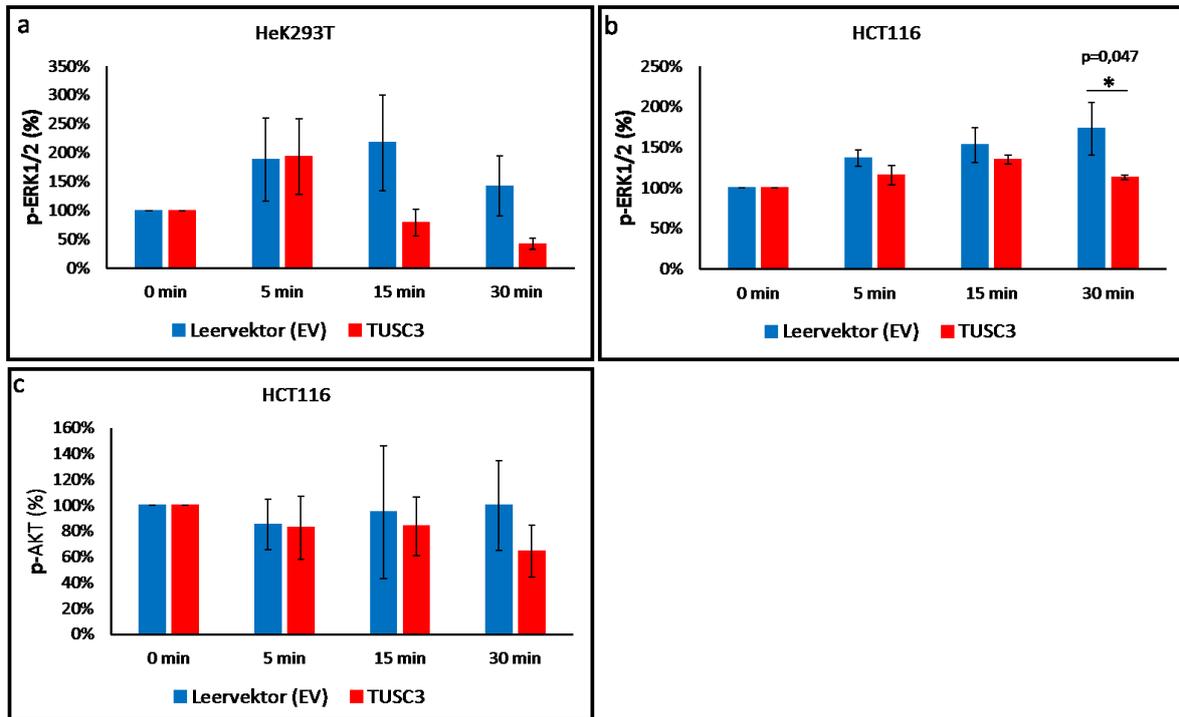


Abbildung A1: Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die nachgeschalteten AKT/ERK1/2-Signalwege

Karzinomzellen (HCT116, HEK293T) wurden mit einem leeren Vektor (EV, blau) bzw. TUSC3-Plasmid (rot) für 72 h transfiziert, bevor ihnen für 16 h das Nährmedium entzogen wurde. Anschließend wurden die Zellen in einer Kurzzeitkinetik für 0 min, 5 min, 15 min und 30 min mit 20 % FBS stimuliert. Die extrahierten Proteine wurden in einer „Western Blot“-Analyse unter Verwendung eines p-AKT- bzw. p-ERK1/2-spezifischen Antikörpers (60 bzw. 42/44 kDa) eingesetzt. Als Kontrolle diente g-ERK (42/44 kDa).

a) Analyse des Einflusses von TUSC3 auf den ERK1/2-Signalweg. Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse in HEK293T-Zellen mit ImageJ. **b)** Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse in HCT116-Zellen mit ImageJ. (n=3; *: p<0,05 EV gegen TUSC3; „Two-Way“ ANOVA). **c)** Analyse des Einflusses von TUSC3 auf den AKT-Signalweg. Quantitative Auswertung der „Western Blot“-Analyse in HCT116-Zellen.

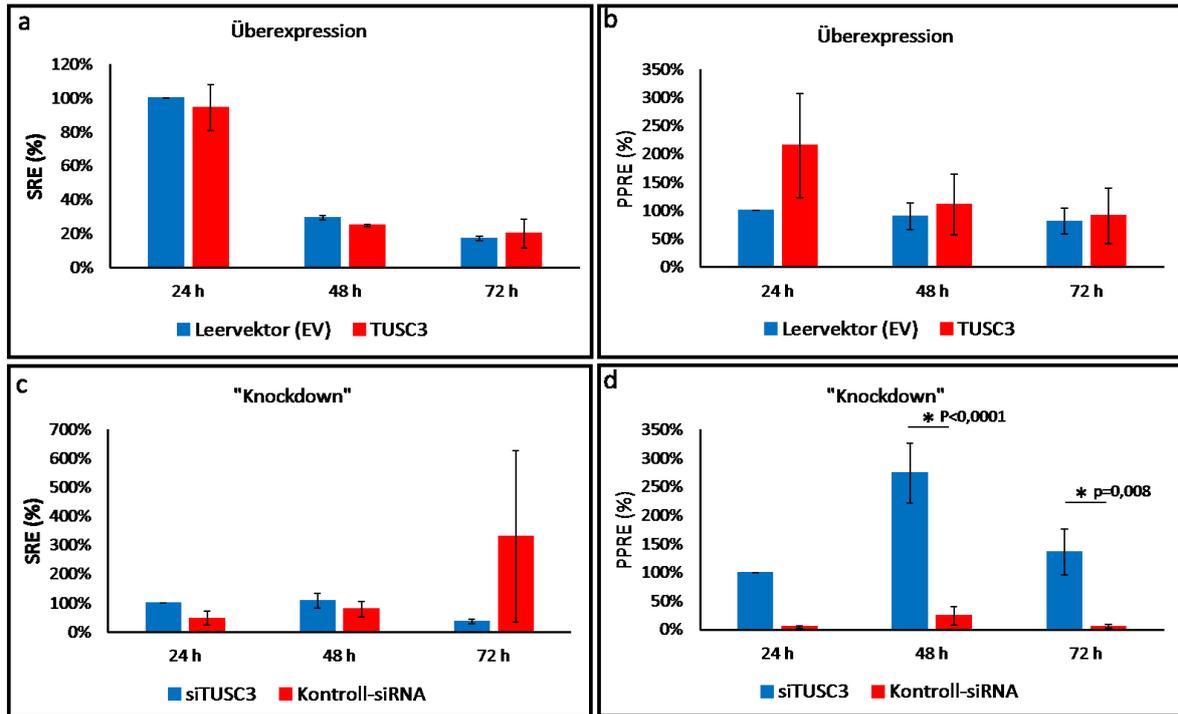


Abbildung A2: Luciferase-Test zur Analyse des Einflusses von TUSC3 auf die EGFR-Signaltransduktion

a+b) HEK293T-Zellen wurden mit Leervektor (EV, blau) bzw. TUSC3 (rot) und entsprechendem Reporterplasmid co-transfiziert. Proteine wurden 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion für einen Luciferase-Test geerntet und die Luciferaseaktivität des entsprechenden Reporterplasmids gemessen. **a)** Luciferase-Test für das SRE-Reporterplasmid. **b)** Luciferase-Test für das PPRE-Reporterplasmid. **c+d)** TUSC3-„Knockdown“ in HCT116-Zellen bzw. Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA. Die Zellen wurden mit SRE-Reporterplasmid (c) bzw. PPRE-Reporterplasmid (d) co-transfiziert (n=4; *p<0,05 Kontroll-siRNA gegen siTUSC3; „Two-Way“ ANOVA).

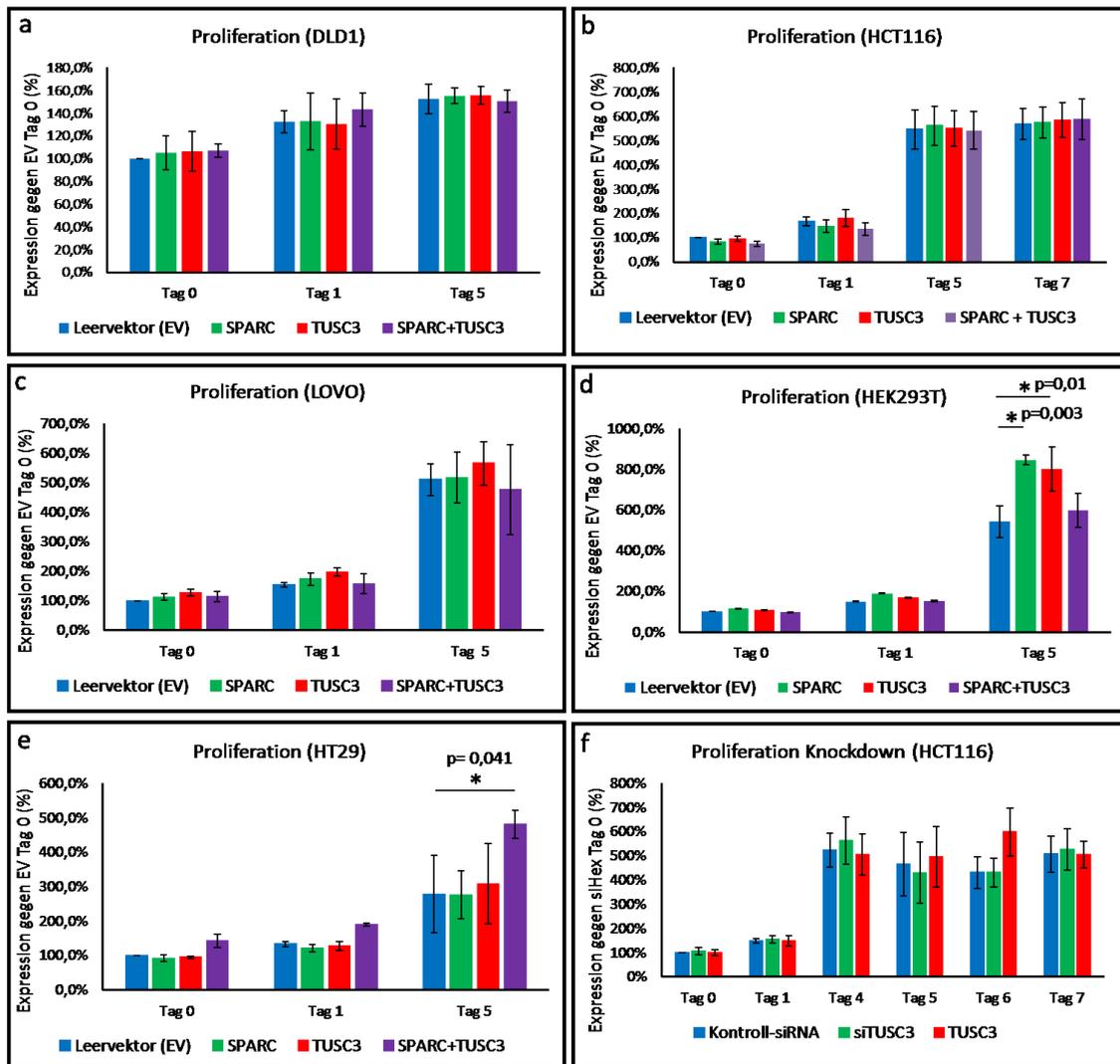


Abbildung A3: Einfluss von TUSC3 auf die Proliferation in kolorektalen Karzinomzellen

DLD1-, HCT116-, LOVO-, HEK293T- und HT29-Zellen wurden mit einem Leervektor (EV, blau), SPARC (S, grün), TUSC3 (T, rot) oder einer Kombination aus SPARC und TUSC3 (S+T, violett) transfiziert. Tag 0 entspricht 24 h nach der Transfektion. Nach entsprechender Transfektion der Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen eine MTT-Messung durchgeführt.

a) Proliferationstest von DLD1-Zellen. b) Proliferationstest von HCT116-Zellen. c) Proliferationstest von LOVO-Zellen. d) Proliferationstest von HEK293T-Zellen (n=2; *p<0,05 EV gegen S+T und EV gegen S, „two-way“ ANOVA). e) Proliferationstest von HT29-Zellen.

f) Graphische Darstellung der siRNA-vermittelten Herunterregulierung von endogenem TUSC3 ("knockdown") in HCT116 Zellen.

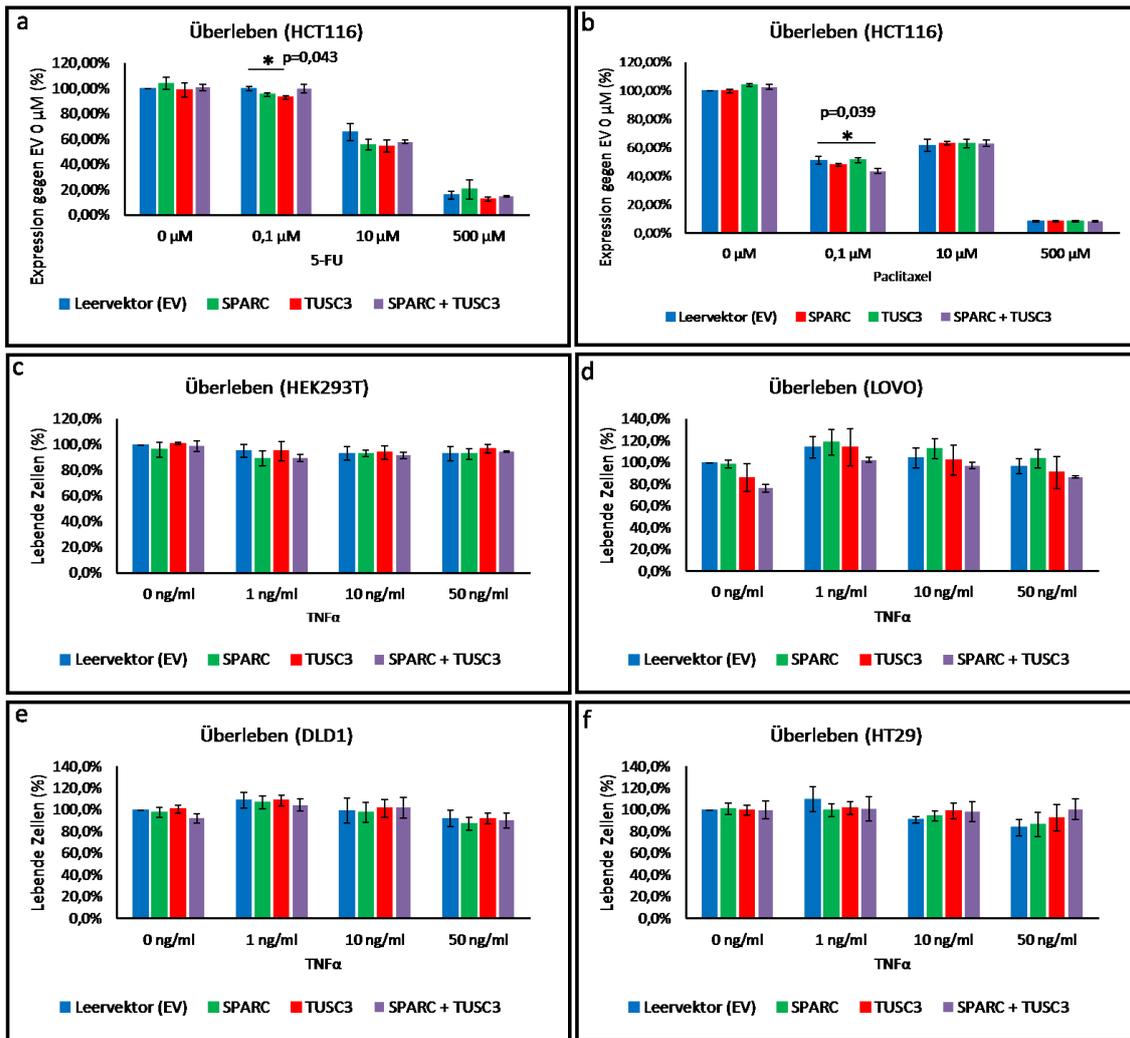


Abbildung A4: Einfluss von TUSC3 auf das Wachstum von KRK-Zellen unter Einfluss verschiedener Chemotherapeutika

Die verschiedenen Zellen wurden mit einem Leervektor (EV, blau), SPARC (S, grün), TUSC3 (T, rot) oder einer Kombination aus SPARC und TUSC3 (S+T, violett) transfiziert. Tag 0 entspricht 24 h nach der Transfektion. Es wurde ein Zytotoxizitätstest der KRK-Zellen unter Einwirkung verschiedener Chemotherapeutika durchgeführt. Eine Messung erfolgte 24 bzw. 48 h nach Beginn der Behandlung mit Chemotherapeutika. **a)** Anzahl lebender HCT116-Zellen nach Behandlung mit 5-FU (0-500 µM) (n=2; *p<0,05 EV gegen TUSC3, T-Test; „two-way“ ANOVA = ns). **b)** Anzahl lebender HCT116-Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel (0-500 µM) (n=2; *p<0,05 EV gegen S+T, T-Test; „two-way“ ANOVA = ns). **c-f)** Anzahl lebender Zellen nach Behandlung mit TNF-α (0-100 mg/ml) und Cycloheximid (0,1 µM). **c)** Zytotoxizitätstest in HEK293T-Zellen. **d)** Zytotoxizitätstest in LOVO-Zellen. **e)** Zytotoxizitätstest in DLD1-Zellen. **f)** Zytotoxizitätstest in HT29-Zellen.

Materialien

Tabelle T1: Liste der verwendeten Materialien

Produkt	Firma
0,25 % Trypsin-EDTA	Gibco / life technologies
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck
2-Mercaptoethanol ≥99 %	Sigma Aldrich
2-Propanol (Isopropanol) EMSURE	Merck
5-Fluoruracil (Benda-5 FU 50 mg/ml)	Bendalis
6 x DNA loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Acetic acid ≥ 99,0 % (T) (Eisessig)	Sigma Aldrich
Albumin, Bovine Serum, Fraction V (BSA)	Merck Millipore
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen
Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse	Invitrogen
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit	Invitrogen
Alexa Fluor 594 Phalloidin	Invitrogen
Amersham Protran 0,2 µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
Antigen unmasking solution	Vector Laboratories
Bad stabil	Neolab
Bromphenol blue	Sigma Aldrich
Calnexin (C5C9) Rabbit mAb	Cell Signaling
CD71 (071 C3B8 2A1)(Transferrin Rezeptor)	Santa Cruz Biotechnology (sc-32272)
Cell culture lysis 5 x reagent	Promega
Cellstar 6 Well Cell Culture Plate	Greiner bio-one
Cellstar 96 Well Cell Culture Plate	Greiner bio-one
Cellstar Cell Culture Dishes 10 cm	Greiner bio-one
Cellstar Cell Culture Dishes 14,5 cm	Greiner bio-one
Cellstar Cell Culture Dishes 6 cm	Greiner bio-one
Cellstar Cell Culture Flasks, Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm ²	Greiner bio-one
Cellstar Cell Culture Flasks, Zellkulturflasche 50 ml, 25 cm ²	Greiner bio-one
Centrifuge tubes 15 ml	Greiner bio-one
Centrifuge tubes 50 ml	Greiner bio-one
Cleaved PARP Mouse mAb	Cell signaling (#9548)
complete tablets mini EASYpack	Roche
Cycloheximid (CHX) from Streptomyces Griseus	Sigma Aldrich
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako North America
DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole	Carl Roth

DLD1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco / life technologies
Dneasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
DYKDDDDK Taq Rabbit Ab	Cell Signaling (2368S)
EDTA	Sigma Aldrich
EGFR (528) FITC	Santa Cruz Biotechnology (sc-120 FITC)
EGFR (D38B1) anti-rabbit	Cell Signaling (4267S)
EpiMark Bisulfite Conversion Kit	New England Biolabs
EpiTect Control DNA (human) methylated and bisulfite converted	Qiagen
EpiTect MethyLight PCR	Qiagen
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Qiagen
ERK2 (C-14)	Santa Cruz Biotechnology (sc-154)
Ethanol, absolute, ≥ 98 % (GC)	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid Solution 10 mg/ml	Invitrogen
Formaldehydlösung 37 % ROTIPURAN	Carl Roth
Gene Chip Human Gene 2.0 ST Array	Affymetrix
GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready to use	Thermo Fisher Scientific
Glycerol 99+ %	Sigma Aldrich
Glycin PUFFERAN ≥ 99 % p.a.	Carl Roth
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega
GoTaq Green Master Mix	Promega
HCT116	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
HEK293T	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
HEPES PUFFERAN ≥99,5 %	Carl Roth
Highspeed Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen
HSP90 α/β (H-114)	Santa Cruz Biotechnology (sc-7942)
HT29	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
Hy Clone Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Hydrochlorid acid	Sigma Aldrich
Hydrogen Peroxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck
Illumina MiSeq Sequenzierungssystem	Illumina
Lamin A/C (H-110)	Santa Cruz Biotechnology (sc-20681)
LB Agar (Lennox)	Carl Roth
LB Medium (Lennox)	Carl Roth
LE Agarose	Biozym
L-Glutamin	Gibco / life technologies
Lia Plate, 96 Well, white, F-bottom	Greiner bio-one
LOVO	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Luciferase assay reagent	Promega
Luminol	Sigma Aldrich
Magnesium Chlorid Hexahydrat (MgCl ₂)	Merck
Mayer's Hämalaunlösung	Merck
Methanol ≥ 99,8 % (GC)	Sigma Aldrich
Milchpulver blotting grade	Carl Roth
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina
Monoclonal ANTI-FLAG M2 1 mg/ml	Sigma Aldrich (F1804-200UG)
Multiply μ strip pro 8er Kette	Sarstedt
Nuclease free water	Promega
ON TARGET plus Human TUSC3 (7991) siRNA SMARTpool, 5 nmol	Dharmacon / GE Healthcare
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell signaling (#4695)
p44/42 MAPK (P-ERK) anti-rabbit	Cell Signaling (9101S)
Paclitaxel (Kabi) 6 mg/ml	Fresenius Kabi
PageRuler Protein Ladder 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific
P-AKT (T308) anti-rabbit	Cell Signaling (2965S)
PARP Antibody	Cell Signaling
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco / life technologies
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH
p-Coumaric acid	Sigma Aldrich
P-EGF Rezeptor (Y1068) anti-rabbit	Cell Signaling (#3777S)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco / life technologies
PeqGold Total RNA Kit	PeqLab (VWR)
P-ERK (E-4)	Santa Cruz Biotechnology (sc-7383)
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Laboratories
Pierce EGFR Antibody (H11)	Thermo Fisher Scientific (MA5-13070)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S solution	Sigma Aldrich
Power SYBR Green PCR MasterMix	Applied Biosystems
Rb bAb to TUSC3	Abcam
Rnase free Dnase Set (Dnase I Verdau)	Qiagen
Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)	Carl Roth
RPMI Medium 1640	Gibco / life technologies
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Safe Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf
SDS, ultra pure ≥99,5 %	Carl Roth
Sodium Chloride (NaCl)	Sigma Aldrich
Sodium Orthovanadate	Sigma Aldrich
Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells	Invitrogen
SW480	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
Tecan Reader M200	Tecan

Temed 99 %	Carl Roth
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma Aldrich
TNFalpha, mouse 5 µg	Roche
Tripur Hydrochlorid acid 1N	Merck
TRIS PUFFERAN ≥99,9 % Ultra	Carl Roth
Triton-X-100	Merck
Trizma base ≥ 99,9 %	Sigma Aldrich
TruSeq Nano DNA Library Preparation Kit	Illumina
Tunicamycin from a Streptomyces species	Sigma Aldrich (T7765 – 1MG)
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
TUSC3 pAb anti-TUSC3 anti-goat	Novus (NBP1 00248)
TUSC3 pAb anti-TUSC3 anti-rabbit	Novus (NBP1-55630)
Tween 20	Carl Roth
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories
Verso cDNA synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
Whatman 3 mm CHR	GE Healthcare
Xylol (Isomere) ≥ 98,5 %	Carl Roth
β-Actin	Santa Cruz Biotechnology (sc-69879)
β-Glycerophosphat (disodium salt hydrate)	Sigma Aldrich

Geräte

Tabelle T2: Liste der verwendeten Geräte

Produkt	Firma
Agarose-Gelkammer	BioRad
AxioCam MRm	Carl Zeiss
BD FACSCanto	BD Biosciences
BRANSON Sonifier 250	Branson
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus
Elektrophorese Kammer	BioRad
Falconzentrifuge Rotanta/RP	Hettich
Fusion Solo	PeqLab (VWR)
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf
Homogenisator T10 basic	IKA
HXP 120	Carl Zeiss
Imager.D1	Carl Zeiss
Incubator Jouan	Thermo Fisher Scientific
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Sigma
Mikroskop Axiovert 25	Omnilab
Mikrowelle	Moulinex
Nanodrop 2000C Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
PCR Maschine Primus	MWG-Biotech
pH-Meter 766 calimatic	Knick
Power Pac Basic	BioRad
Power Supply PPS 200-10	BioRad
Real Time Maschine 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Schüttler Certomat HK	B. Braun Biotech international
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Tischzentrifuge Centrifuge J415B	Eppendorf
Transferkammer	BioRad
UV Kammer Gel iX 20 Imager	Intas science imaging Instruments
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph
Wasserbad Certomat WR	B. Braun Biotech international

Primertabelle

Tabelle T3: Liste der verwendeten Primer

Oligoname	Sequenz (5' --> 3')	Modifikation	Größe
MethyLight			
FAMQ-hTUSC3prob	TACGCGCGGTAGTCGTGCGC (20)	5'-FAM, 3'-BHQ1	
5-hTUSC3methyl	CCGAACAAACGTAATACG (20)		105bp
3-hTUSC3methyl	ACGGCGTGAAGGAGCG (16)		
huACTBprobemethyl	ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA (30)	5'-FAM, 3'-BHQ1	
5-huACTBmethyl	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT (25)		132bp
3-huACTBmethyl	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTAA (27)		
RNA Analyse			
5-hTUSC3rna	GCAGCTGATGGAATGGAGTT (20)		380bp
3-hTUSC3rna	ATCCGTTCTGTCAGCAATCC (20)		
Next Generation Sequencing			
PyT3v2-RV	CRACAAAACAATATCTCCTC (20)		294bp
PyT3v2-FW	GGTTTTAGGGTTAAAGGATTA (21)		
Array Hit qPCR			
5-hMGAT3	CTCAGCCCTAACCTGGTGTC (20)		110bp
3-hMGAT3	TGGGAGTAGAGTGGGGTACG (20)		
5-hMGAT1	GGTGGAGAAAGTGAGGACCA (20)		168bp
3-hMGAT1	CGGAACTGGAAGGTGACAAT (20)		
5-hBAK1	CCTGTTTGAGAGTGGCATCA (20)		146bp
3-hBAK1	AGTGATGCAGCATGAAGTCG (20)		
5-hBCL2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA (20)		136bp
3-hBCL2	ACAGTTCCACAAAGGCATCC (20)		

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung für die Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Frankfurt am Main, _____

Patrick Höde