

Fabia Ola Tschaika Fricke

Dr. Sc. hum.

Comprehensive Molecular Profiling of Extracellular Vesicles in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers

Fach/Einrichtung: Pathologie

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

Extrazelluläre Vesikel (EV) werden von verschiedenen Zellen als Membranpartikel freigesetzt und spielen eine zentrale Rolle in der interzellulären Kommunikation, indem sie eine Vielzahl an Botenstoffen (Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und Kohlenhydrate) zu bestimmten Zielzellen transportieren. Je nach Zusammensetzung des molekularen EV-Cargos können die Botenstoffe verschiedene biologische Antworten in den Zielzellen hervorrufen und das umliegende Gewebe sowie periphere Organe in ihrer Funktion beeinflussen. Neben der wichtigen biologischen Funktion ist das EV-Cargo aus klinischer Perspektive äußerst interessant. Zahlreiche Studien haben bereits belegt, dass EVs zu einem gewissen Anteil den Phänotyp und biologischen Status ihrer Mutterzelle widerspiegeln. Aufgrund dessen zeichnen sich EVs prinzipiell als minimal-invasive diagnostische Biomarker aus.

DNA Mismatch Reparatur-defizitäre Darmtumore sind durch den genetischen Phänotyp der Mikrosatelliten Instabilität (MSI) charakterisiert. Der Funktionsverlust von dem Mismatch Reparatur System führt zu einer Akkumulation von somatischen Insertion- oder Deletion (Indel) Mutationen, insbesondere in Genen mit kurzen, repetitiven DNS Sequenzen. Sowohl molekularbiologisch als auch klinisch weisen MSI Tumore entscheidende Unterschiede zu anderen kolorektalen Subtypen auf, weshalb die MSI-Identifizierung von medizinischer Bedeutung ist.

Der erste Teil dieser Dissertationsarbeit hat sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob EVs den MSI-spezifischen Phänotyp ihrer Mutterzelle reflektieren. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass EVs die MSI Tumorspezifischen Indel-Mutationen in nicht-kodierenden Markern als auch in kodierenden MSI Zielgenen vorweisen. Ein Vergleich zwischen den MSI-Tumorzellen und den EV-Mutationsprofilen ergab eine Übereinstimmung ihrer genetischen Veränderungen. Dieses Ergebnis hebt das klinische und diagnostische Potential der EVs hervor und bildet die Grundlage für die Entwicklung eines EV-basierten MSI Typisierung Tests.

Der zweite Teil dieser Arbeit hat die biologischen Konsequenzen einer einzelnen MSI Tumor Treiber Mutation (*Transformierender Wachstumsfaktor Beta Rezeptor Typ 2; TGFBR2*) auf das EV-Cargo untersucht. Zwar wurden die Auswirkungen des Expressions- und Funktionsverlustes von TGFBR2 auf die Tumorbilogie von MSI Tumorzellen bereits beschrieben, doch berichtet die vorliegende Arbeit zum ersten Mal über den Effekt der TGFBR2-Defizienz auf das (Phospho) Proteom und miRNAome der EVs. Durch die Verwendung eines Doxycyclin-induzierbaren MSI Zelllinien Modells, welches die Expression von einer Einzelkopie des *TGFBR2*-Transgens in einem isogenen Hintergrund erlaubt und durch die Anwendung von small RNA Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass sich die microRNA Profile (n=10) zwischen EVs von TGFBR2-defizitären und -profizienten MSI Tumoren signifikant unterscheiden. *In silico* Netzwerkanalysen haben ergeben, dass diese

TGFBR2-regulierten microRNAs die Transkription von 18 Zielgenen hemmen können, welche eine zentrale Rolle in der intrazellulären TGFBR2-Signalkaskade spielen. Weitere TGFBR2-abhängige quantitative Unterschiede wurden in dem (Phospho) Protein Profil der EVs mit Hilfe von metabolischer Markierung und Massenspektrometrie identifiziert. Hochregulierte Proteine wurden mit dem Nukleosom und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix assoziiert. Darüber hinaus konnten verschiedene herunterregulierte proteosomale Proteine in den EVs von TGFBR2-defizienten Tumorzellen gefunden werden. Insgesamt wurde beobachtet, dass der Funktionsverlust von TGFBR2 die Expression von 48 EV-Proteinen sowie die Phosphorylierung von 49 Aminosäuren in 37 verschiedenen EV-Phosphoproteinen moduliert. Besonders auffällig war, dass das Protein Fibronectin sowohl eine hochregulierte Expression als auch eine Hyperphosphorylierung vorwies. Im Gegensatz zu Fibronectin wurde das Protein Cyclin-abhängige Kinase 1 signifikant herunterreguliert detektiert. Die vorliegende Arbeit gibt wichtige Hinweise auf einen dynamischen Zusammenhang zwischen der TGFBR2-Signalkaskade und der Phosphorylierung von EVs. Interessanterweise wurden fünf TGFBR2-regulierte phosphorylierte Aminosäuren als Substrat der Cyclin-abhängigen Kinase 1 identifiziert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Verbindung zwischen dem quantifizierten EV-Protein Profil und der veränderten Phosphorylierung von EV-Phosphoproteinen hin. Da die Funktion der EVs durch das molekulare Profil bestimmt ist, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass TGFBR2-abhängige Veränderungen im EV-Cargo unterschiedliche Zellantworten hervorrufen könnten. Im Hinblick auf den in kolorektalen MSI Tumoren vorliegenden TGFBR2 Expressions- und Funktionsverlust sind die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Auswirkungen der TGFBR2-Defizienz auf das EV microRNA und (Phospho) Protein Profil von höchster biologischer und klinischer Relevanz. Die TGFBR2-abhängigen Veränderungen im EV Cargo erschienen EV-spezifisch, da solche Veränderungen nicht in den parentalen MSI Tumor Zellen gefunden worden sind. Dieses TGFBR2-abhängige molekulare EV-Profil stellt die Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen dar, um das Verständnis der MSI Tumorbiologie im Kontext der interzellulären Kommunikation zu erweitern.