

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische
Immunologie und Rheumatologie)

**Charakterisierung der Rolle von ASPP2 κ
beim Kolorektalen Karzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Rieger, Ingmar Andreas

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schittenhelm

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Graepler

3. Berichterstatter: Professor Dr. A. Wicki

Tag der Disputation: 20.02.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Kolorektale Karzinom.....	3
1.1.1	Ätiologie und Risikofaktoren des KRK.....	6
1.1.2	Die Tumorgenese des KRK.....	7
1.1.3	Molekulare Marker für Prognose und Therapieansprechen.....	10
1.1.4	Stadieneinteilung und Therapieschema des KRK.....	11
1.2	Das Tumorsuppressorprotein p53.....	12
1.2.1	Aktivierung von p53.....	12
1.2.2	Funktionen von p53.....	12
1.2.3	Die Rolle von p53 in Tumorerkrankungen.....	14
1.3	Die Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP)...	15
1.3.1	Mitglieder der ASPP.....	15
1.3.2	ASPP2.....	18
1.3.3	ASPP2k.....	19
1.4	Ziel der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Bezugsquellennachweis.....	22
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.2	Geräte.....	23
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.4	Primer.....	26
2.1.5	Probes.....	26
2.1.6	Reagenzien-Kits.....	26
2.2	Zelllinien.....	27
2.3	Patientenkollektiv.....	28
2.4	Zellkultivierung.....	30
2.5	Zellkryokonservierung und Auftauen.....	30
2.6	Erstellung von ASPP2k überexprimierenden Zellen.....	31
2.6.1	Transformation von ASPP2k knock-in DNA-Plasmiden in Bakterien und Plasmidisolierung.....	31

2.6.2	Transfektion von ASPP2k knock-in DNA-Plasmid in kolorektale Tumorzellen	32
2.6.3	Selektion und Transfektionskontrolle der ASPP2k knock-in Zellen	32
2.7	Erstellung von ASPP2k herunterregulierten Zellen	33
2.7.1	Transformation von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in Bakterien und Plasmidisolierung	33
2.7.2	Transfektion von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in HEK293T Zellen und Produktion von Lentiviren	33
2.7.3	Lentivirale Transduktion von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in DLD-1 p53 ^{+/+} bzw. HCT-116 p53WT	34
2.7.4	Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen und Transduktionskontrolle	34
2.8	Genexpressionsanalyse der Zelllinien mittels qRT-PCR	35
2.8.1	RNA Extraktion sowie Quantitäts- und Qualitätsbestimmung	35
2.8.2	cDNA Herstellung	35
2.8.3	Die Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	36
2.9	Genexpressionsanalyse des Patientenmaterials mittels Zelllyse und qRT-PCR	37
2.10	Proliferationsanalyse und zytologische Ermittlung der Verdopplungszeit	37
2.11	Apoptosebestimmung mittels FACS- Analyse	39
2.11.1	FACS	39
2.11.2	Apoptosebestimmung mittels FITC/ PI und APC/ 7-AAD	40
2.11.3	Behandlung der Zellen und Messung des Apoptoseverhaltens	41
2.12	Migrationsanalyse	42
2.12.1	Transwell Migrationsassay	42
2.12.2	Wundheilungsassay	43
2.13	Statistische Analyse	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Kolorektale Karzinome weisen eine erhöhte ASPP2k Expression im Vergleich zum tumorfreen Gewebe auf	45
3.2	ASPP2k-Expression ist stressinduzierbar im KRK	48

3.3	Etablierung und Validierung der isoformspezifischen ASPP2k überexprimierenden und attenuierten Zellmodelle	49
3.4	ASPP2k moduliert die Sensitivität gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose im kolorektalen Tumorzellmodell	53
3.4.1	Überexpression von ASPP2k führt zu gesteigerter Resistenz gegenüber Oxaliplatin	54
3.4.2	Suppression der ASPP2k-Expression führt zu gesteigerter Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Oxaliplatin	56
3.5	ASPP2k beeinflusst die Zellproliferation in kolorektalen Tumorzellen .	57
3.5.1	Überexpression von ASPP2k resultiert in gesteigerter Proliferation	58
3.5.2	Suppression der ASPP2k-Expression resultiert in signifikant attenuierter Proliferation.....	59
3.5.3	ASPP2k-Expression beeinflusst die Verdopplungszeit	61
3.6	ASPP2k beeinflusst das Migrationsverhalten von kolorektalen Tumorzellen	62
3.6.1	Überexpression von ASPP2k resultiert in gesteigerter Migration .	62
3.6.2	Suppression von ASPP2k resultiert in attenuierter Migration	64
3.6.3	Überexpression von ASPP2k bestätigt im Wundheilungsassay das erhöhte Migrationspotenzial.....	65
3.6.4	Suppression von ASPP2k resultiert in verzögertem Wundverschluss	67
4	Diskussion	68
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis.....	78
7	Erklärung zum Eigenanteil	86
8	Liste der Veröffentlichung	87
9	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs).....	3
Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Modell von Fearon und Vogelstein.....	9
Abbildung 3: Struktur der ASPP-Familie.	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptoseinduktion durch ASPP1/2 und p53 Interaktion.....	16
Abbildung 5: Regulation der p53-abhängigen Apoptose durch die ASPP Mitglieder.....	17
Abbildung 6: Das Fehlen von Exon 17 führt zu einem früheren Translationsstopp mit trunkiertem C-Terminus.....	20
Abbildung 7: ASPP2k spezifische qRT-PCR zeigt signifikant erhöhte ASPP2k mRNA-Expressionslevel in kolorektalem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Kolongewebe.	45
Abbildung 8: ASPP2k spezifische qRT-PCR zeigt in 45% der Fälle eine signifikant erhöhte ASPP2k-Expression der kolorektalen Tumorgewebeproben im Vergleich zum benachbarten tumorfreen Gewebe.....	46
Abbildung 9: ASPP2k spezifische qRT-PCR von zwei kolorektalen Zelllinien zeigt eine signifikant erhöhte ASPP2k-Expression nach 24h Inkubation bei RT.	48
Abbildung 10: Nach erfolgreicher Transfektion zeigen ASPP2k.DLD-1 und ASPP2k.HCT-116 im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression von ASPP2k.	50
Abbildung 11: Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der erfolgreich transduzierten Zellen.	51
Abbildung 12: Nach erfolgreicher Transduktion zeigen shASPP2k.DLD-1 und shASPP2k.HCT-116 eine signifikant verminderte ASPP2k-Expression im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle.....	52
Abbildung 13: Reduzierte Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Oxaliplatin bei heraufregulierter ASPP2k-Expression.	54
Abbildung 14: Suppression der ASPP2k-Expression führt zu höheren Apoptoseraten nach Behandlung mit Oxaliplatin.....	56
Abbildung 15: ASPP2k überexprimierende Zellen zeigen im Proliferationsassay eine signifikant erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu ihren EV-Kontrollen.	58

Abbildung 16: Suppression der ASPP2 κ -Expression resultiert in einer abgeschwächten Proliferationskapazität.	60
Abbildung 17: Überexpression von ASPP2 κ führt in kolorektalen Karzinomzellen zu einem signifikant erhöhten Migrationspotenzial.	63
Abbildung 18: ASPP2 κ -Suppression führt in kolorektalen Tumorzellen zu einer signifikant reduzierten Migrationsfähigkeit im Transwell-Migrationsassay.....	64
Abbildung 19: ASPP2 κ überexprimierende Zellen zeigen im Wundheilungsassay ein gesteigertes Migrationsverhalten.....	65
Abbildung 20: ASPP2 κ -Suppression führt in kolorektalen Karzinomzellen zu einer reduzierten Migrationskapazität im Wundheilungsassay.	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Zelllinien	27
Tabelle 2: Patientenproben	29
Tabelle 3: Relative ASPP2 κ -Expression der kolorektalen Tumorproben im Vergleich zur ASPP2 κ -Expression des gesunden kolorektalen Gewebes desselben Patienten.....	47
Tabelle 4: Ermittelte IC50- Konzentrationen nach Oxaliplatinbehandlung in ASPP2 κ .DLD-1 und EV.DLD-1 sowie ASPP2 κ .HCT-116 und EV.HCT-116. ...	55
Tabelle 5: Ermittelte IC50- Konzentrationen für Oxaliplatinbehandlung in shASPP2 κ .DLD-1 und shEV.DLD-1 sowie shASPP2 κ .HCT-116 und shEV.HCT-116.	57
Tabelle 6: Verdopplungszeit t_d der ASPP2 κ modifizierten Zelllinien im Vergleich zu den EV-Kontrollen.	61

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μl	mikroliter
μM	mikromolar
5FU	5-Fluorouracil
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
ASPP	Apoptose stimulierende Proteine von p53
ASPP2	Apoptose stimulierende Protein von p53-2
ASPP2k	ASPP2kappa
Bak	Bcl-2 homologous killer
Bax	Bcl-2 assoziiertes-X Protein
Bbp	Bcl-2 Bindungsprotein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-x	Bcl- 2 associated X protein
BRAF	v-Raf Murine Sarkoma Viral Oncogene Homolog B1
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CDK1A	Cyclin-dependent kinase 1A
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dMMR	mismatch repair deficiency
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EV	Empty- vector

FACS	fluorescence activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FOLFOX	Therapieschema aus Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin
FS	Folinsäure
FSC	forward light scatter
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
Hyclone-DMEM	Hyclone-Dulbecco´s Minimum Essentials Medium
K-RAS	Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
MSI-H	hochgradige Mikrosatelliten-Instabilität
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
Noxa	„Schaden“ (latein): pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PIG3	p53 induced gene 3
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PS	Phosphatidylserin
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis

qRT-PCR	quantitativen real time- PCR
RAS	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time- PCR
shRNA	short-hairpin RNA
SSC	Sideward scatter
tGFP	TurboGFP
TP53	Tumorprotein 53
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
v/v	Volumen/Volumen
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1 Einleitung

Kolorektale Karzinome (KRK) gehören zu den Tumorentitäten mit einer der höchsten Inzidenz in beiden Geschlechtern, welche an unterschiedlichen Lokalisationen im Darm entstehen können. Bei Diagnosestellung präsentieren sich KRK zum Teil als lokalisierte, chirurgisch heilbare Erkrankungen, jedoch ebenso als bereits metastasierte Tumore mit schlechter Prognose. Sowohl die hohen Erkrankungs- als auch Sterberaten fordern Ärzte und Wissenschaftler verschiedener Fachrichtungen heraus und bedingen ein weitreichendes Verständnis der Tumorphagenese, um geeignete Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln.

Bereits seit seiner erstmaligen Beschreibung 1979 wird dem Tumorsuppressorprotein 53 (p53) eine zentrale Rolle in der Tumorgenese zugewiesen und die Erforschung des TP53-Signalnetzwerks ist seitdem wichtiger Bestandteil der Tumorforschung. Die Inaktivierung des Proteins ist hierbei ein Schlüsselereignis bei der Krebsentstehung und in einer Vielzahl von Tumoren nachweisbar. Durch intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten ist es gelungen zahlreiche Interaktionspartner im Funktionsspektrum von TP53 zu entdecken. Hierunter auch die Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP), welche erheblichen Einfluss auf die Transkriptionsinduktion von proapoptische Effektorgenen besitzt. 2019 wurde in unserer Forschungsgruppe eine Spleißvariante von ASPP2, namens ASPP2k entdeckt, das onkogenes Potenzial besitzt und zu einem aggressiveren Phänotyp der Tumorzellen führt.

In der vorliegenden Arbeit wird ASPP2k erstmals im KRK nachgewiesen und untersucht, welchen Einfluss die Expression auf zentrale Tumorzelleigenschaften besitzt. Einleitend werden die epidemiologischen und pathologischen Grundlagen sowie Therapieoptionen des KRK aufgezeigt, sowie die aktuelle Studienlage der ASPP2k Forschung erläutert. Im Anschluss werden die zugrundeliegenden Untersuchungsmethoden und Forschungsergebnisse

dieser Dissertationsarbeit beschrieben. Zuletzt werden die Studienergebnisse diskutiert, interpretiert sowie in den aktuellen Forschungskontext eingeordnet.

Während der Arbeit an dieser Dissertation wurden die Ergebnisse sowie Ideen der Forschung bereits in einer renommierten Fachzeitschrift durch unsere Forschungsgruppe veröffentlicht [1]. Entsprechende Passagen dieser Veröffentlichung sind in der Dissertation enthalten und werden mit entsprechender Quellenangabe gekennzeichnet.

1.1 Das Kolorektale Karzinom

In einem gemeinsamen Bericht „Krebs in Deutschland für 2017/2018“ referiert das Robert-Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. über ca. 498.000 erstmalig diagnostizierte Krebserkrankungen, welche mit 229.065 Todesfällen nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in der deutschen Bevölkerung darstellt [2]. Bei genauerer Betrachtung der erhobenen Zahlen ist eine geschlechtsabhängige Inzidenzrate sowie Organmanifestation zu beobachten. Männer erkranken hierbei zahlreicher an Krebs als Frauen und die häufigsten Lokalisationen für Krebs sind bei Männern die Prostata, gefolgt von der Lunge und dem Darm. Die häufigsten Tumorlokalisationen bei Frauen sind hingegen die Brustdrüse, gefolgt von Darm und Lunge [2].

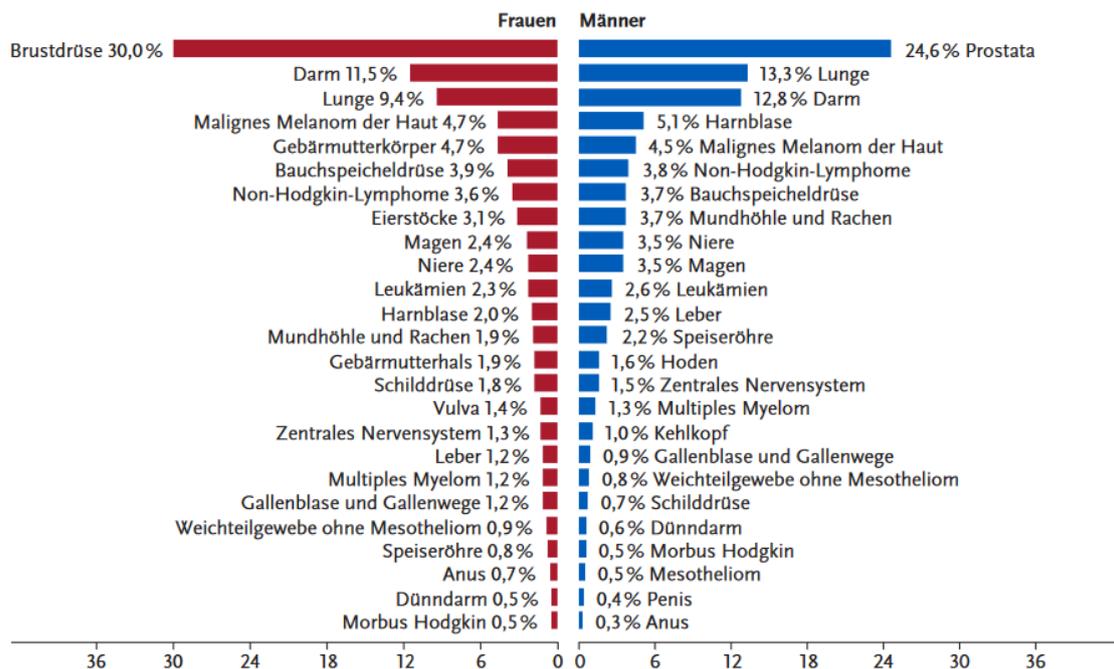


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Abbildung aus [2].

Somit betrifft etwa jede achte Krebsneuerkrankung den Dickdarm (Kolon) bzw. den Mastdarm (Rektum). Dies entspricht etwa 33.920 Erstdiagnosen eines KRK

bei Männern und 26.710 Erstdiagnosen bei Frauen. Mit ca. 25.000 krebsassoziierten Todesfällen pro Jahr, welche auf eine Neoplasie im Darm zurückzuführen sind, ist das KRK in beiden Geschlechtern an dritter Stelle aller Krebssterbefälle in Deutschland gelistet [2, 3].

Betrachtet man die Faktoren, welche für die Prognosebestimmung bei Erstdiagnose von Bedeutung sind, so ist vor allem der Diagnosezeitpunkt sowie die Lokalisation und Ausbreitung in umliegende Organe und Lymphknoten des Tumors entscheidend für den weiteren Verlauf der Tumorerkrankung. Entsprechend der Ausdehnung des Primärtumors (T), dem Befall regionärer Lymphknoten (N) sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) teilt die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) KRK in die Tumorstadien 0- IV ein [4, 5]. Das bei Diagnosestellung ermittelte UICC-Stadium bestimmt dabei den weiteren Behandlungsverlauf und gibt Auskunft über die prognostizierte 5-Jahres-Überlebensrate [5].

Trotz intensiver Forschung im Bereich der Früherkennung und Therapie des KRK ist das kumulative 5-Jahres-Überleben aller Patientinnen und Patienten in den letzten Jahren nur auf 63% bzw. 62% gestiegen und weiterhin erkranken in Deutschland einer von 17 Männern sowie eine von 20 Frauen im Laufe ihres Lebens an Darmkrebs [2, 6]. Die Behandlung des KRK umfasst die drei Säulen der Tumorthherapie, bestehend aus der operativen Resektion, der Radiotherapie und der Chemotherapie, wobei die chirurgische Intervention mit Abtragung von Polypen und Resektion des Tumors im Vordergrund der Behandlung steht. Liegt bei Diagnosestellung kein lokalisiertes Tumorstadium vor, wird unterstützend eine Radio- und/ oder Polychemotherapie präoperativ-neoadjuvant, adjuvant oder in der palliativen Therapie unterstützend eingesetzt [5].

Prädiktive Faktoren, welche zuverlässig und routinemäßig das potenzielle Therapieansprechen des KRK auf die Chemotherapie voraussagen, existieren bisher nur bedingt. Ein Biomarker, dem schon in vielen Tumorentitäten ein solches Potenzial zugeschrieben wurde, ist das Tumorsuppressorgen *TP53*. Es stellt das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichem Krebs mit

nachgewiesenen Mutationen in über 50% aller Malignome dar. Das Vorliegen einer solchen Mutation ist in vielen Tumorentitäten, unter anderem im KRK, mit einem schlechteren Therapieansprechen assoziiert [7-10]. Im KRK ist eine TP53-Genmutationsrate von bis zu 45% beschrieben. Neben Mutationen kann der p53-Signalweg auch durch andere Mechanismen beeinflusst werden, sodass aufgrund seiner zentralen Rolle in der Tumorsuppression die Erforschung der inaktivierenden Mechanismen des Tumorproteins p53 eine wichtige Bedeutung für die zukünftige Behandlung von Krebspatienten darstellt [11]. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle der Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) in Tumoren erforscht und ihr eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben. Für die in unserer Arbeitsgruppe, ursprünglich in der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) neu entdeckten, onkogenen Spleißvariante von ASPP2, genannt *ASPP2kappa* (ASPP2k), lagen bis zum Beginn dieser Forschungsarbeit keinerlei Erkenntnisse für das KRK vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob ASPP2k im KRK nachweisbar und funktionell aktiv ist. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden vier ASPP2k modifizierte isogene kolorektale Zellmodelle etabliert und der Einfluss von ASPP2k auf Tumorzelleigenschaften wie Proliferationsverhalten, Migration und Apoptoseinduktion untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Grundlage zur weiteren Erforschung von ASPP2k im KRK dienen und das Potenzial von ASPP2k als prädiktiven Biomarker sowie mögliches Ziel einer Therapie ergründen.

1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren des KRK

Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen ist es, mit Ausnahme einiger viral ausgelöster Neoplasien, bisher kaum gelungen die krebsauslösenden Faktoren der meisten Tumorentitäten festzustellen. Vor allem durch retrospektive Studien ist es jedoch möglich geworden für viele Tumoren Risikofaktoren zu definieren, deren Vorhandensein potenziell zum Entstehen eines Tumors führt. Beispielsweise ist bekannt, dass übermäßige Exposition von UV-Strahlen kutane Neoplasien und Noxen wie Teerstoffe aus Zigarettenrauch oder Asbest, Tumore des Bronchialsystems bedingen können [12-14]. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Lungenkarzinom, gibt es keinen singulären Risikofaktor, der für die Mehrheit der Darmkrebsfälle verantwortlich ist. Vielmehr wurde eine Vielzahl von Risikofaktoren ermittelt, welche nebeneinander und im Zusammenspiel für die Pathogenese des KRK verantwortlich sind. In epidemiologischen Studien wurden hierbei neben dem Alter und männlichen Geschlecht, auch eine positive Familienanamnese für KRK, der übermäßige Konsum von Alkohol und Nikotin, ungesunde Ernährungsgewohnheiten mit einem hohen Anteil an prozessiertem und rotem Fleisch, Übergewicht sowie Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus identifiziert [15-20]. Weitere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass für die Entstehung von KRK auch begleitende Erkrankungen wie Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder Fusobakterien, ebenso wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von intraepithelialen Neoplasien des Darms verbunden sind [21-24]. Demgegenüber stehen protektive Faktoren wie körperliche Aktivität und präventive Maßnahmen, wie die endoskopische Abtragung von präkanzerotischen Läsionen zur Verringerung des Erkrankungsrisikos [25, 26].

Obwohl die Tumorklassifizierung nach dem TNM- und UICC-Stadium sowie die etablierten molekularen Biomarker wertvolle prognostische Informationen liefern und als Leitfaden für die Therapieentscheidung dienen, lässt sich das Ansprechen und Ergebnis der Tumorthherapie bei einer Vielzahl von Patienten noch nicht zufriedenstellend vorhersagen. Um das Ansprechen auf eine

Chemotherapie besser prognostizieren zu können ist ein tiefgreifendes und weiterführendes Verständnis der vorliegenden Pathomechanismen essenziell, da die molekulare Charakterisierung des KRK entscheidenden Einfluss auf die Behandlung und klinische Prognose hat [27, 28].

Allgemein wird in der Karzinogenese des KRK zwischen Tumoren, welche aus einer spontan auftretenden Adenom-Karzinom-Sequenz resultieren und erblich bedingten Tumoren unterschieden [29]. Die zwei bedeutsamsten Erscheinungsformen des erblichen KRK ist das „hereditäre nicht-polypöse Kolorektale Karzinom“ (HNPCC) bzw. Lynch-Syndrom sowie die „Familiäre adenomatöse Polyposis“ (FAP). Beiden Syndromen liegt eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation zugrunde [30]. Während HNPCC-assoziierten Tumoren ein Defekt im Mismatch-Repair-System zugrunde liegt, weisen FAP-assoziierte Tumore eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC (Adenomatöse Polyposis coli) auf und bilden eine Vielzahl von Polypen mit sehr hohem Entartungspotenzial [31, 32].

1.1.2 Die Tumorgenese des KRK

Die Entstehung des Darmkrebses lässt sich in die Initial-, Promotions- und Progressionsphase unterteilen. Die Karzinogenese beginnt mit der Phase der Initiation, in der es durch genetische Mutationen zur Entstehung von intraepithelialen Neoplasien kommt. Dieser Phase folgt eine mehrjährige präneoplastische Latenzperiode bis zur klinischen Manifestation eines Karzinoms, in welcher die noch gutartigen Tumore durch langsame Zellteilung charakterisiert sind. Durch weitere Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen kann diese Latenzzeit beschleunigt werden und die Tumorgenese in die anschließende Progressionsphase übergehen. Hierbei erlangen die Tumorzellen u.a. mesenchymale Eigenschaften, welche ihnen ermöglichen andere Gewebe zu infiltrieren. Nach Erlangen dieses invasiven Potenzials sind die kennzeichnenden Malignitätskriterien von Krebserkrankungen erfüllt [33-35]. Nachfolgend wird die kolorektale Karzinogenese anhand der etablierten Modelle von Fearon und Vogelstein

sowie Jass et al. dargestellt.

Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Nach dem von Fearon und Vogelstein etablierten Modell entstehen die Mehrheit der KRK sporadisch durch eine Anhäufung spontaner Mutationen [36]. In einer mehrstufigen Adenom-Karzinom-Sequenz, dargestellt in Abbildung 2, entwickeln sich demnach maligne Tumore aus benignen Vorläuferläsionen durch die Akkumulierung von genetischen Mutationen in einer einzelnen Zelle [37]. Dieser meist langwierige Prozess von einer epithelialen Dysplasie bis zur Manifestation eines KRK erfährt in der Regel eine Jahre bis Jahrzehnte dauernde Entwicklungszeit. Die erste Mutation in dieser Abfolge verschafft einer normalen Epithelzelle einen selektiven Wachstumsvorteil, der es ihr ermöglicht, über die sie umgebenden Zellen hinauszuwachsen und einen mikroskopischen Klon zu bilden. In mehr als 80% dieser Adenome ist hierbei als Haupttreiber eine inaktivierende Mutation des Tumorsuppressorgens *APC* nachweisbar [38]. Das entstehende Adenom weist ein nur langsames Wachstum auf, jedoch kann eine zweite Mutation, wie beispielsweise die aktivierende Mutation des *K-RAS* (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog) Onkogens eine Potenzierung des klonales Wachstums auslösen. Tumorzellen in diesem Stadium sind nun zu einer verstärkten Proliferation, mit gestörter DNA-Reparatur und Umgehung der Zellseneszenz sowie einer Neovaskularisation des Tumorgewebes befähigt [39, 40]. Zellen mit nur *APC*-Mutation können weiter persistieren, ihre Zellzahl ist jedoch im Vergleich zu den Tumorzellen mit Mutationen in beiden Genen deutlich geringer. Dieser Prozess der klonalen Expansion setzt sich fort und durch weitere Mutationen in Genen wie *TGF- β* , *PIK3CA* und *TP53* entsteht schließlich ein bösartiger Tumor, welcher invasiv durch die Basalmembran dringt und in umliegende Lymphknoten und Organe metastasieren kann [41].

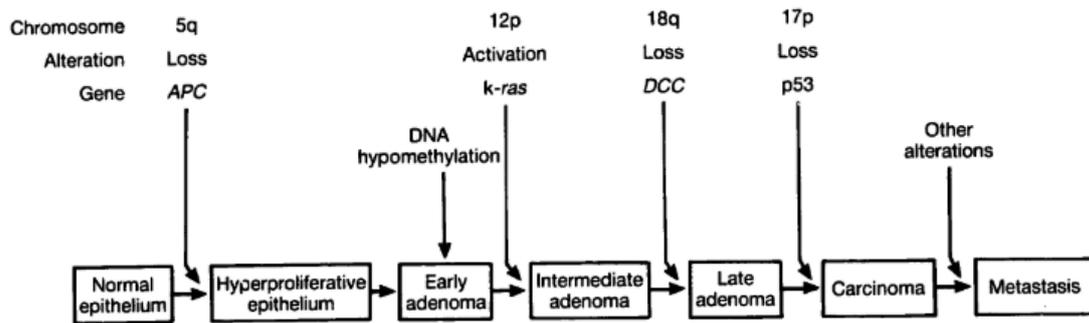


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Modell von Fearon und Vogelstein. Nach diesem Modell der Karzinogenese entsteht aus gesundem Gewebe über gutartige Zwischenformen, sogenannte Adenome, ein bösartiges Karzinom. Abbildung aus [35].

Das beschriebene Modell nach Fearon und Vogelstein bietet die Möglichkeit je nach Zwischenform, in der die Entartung entdeckt wird, eine Prognose über das KRK zu treffen sowie eine entsprechende Therapie einzuleiten. So sind im Rahmen der Krebsvorsorge abgetragene Polypen mögliche Vorstufen einer Krebserkrankung mit nur geringer potenzieller maligner Kompetenz. Eine komplette Entfernung der Polypen kann die spätere maligne Entartung verhindern und zu einer vollständigen Remission führen. Symptomatische Patienten hingegen sind häufig schon in einem fortgeschritteneren Stadium im Sinne der Progressionsphase, was entsprechend die Prognose verschlechtern kann [42].

Mismatch-repair-Versagen und Mikrosatelliten-Instabilität

Man geht davon aus, dass sich etwa 85% der Darmkrebserkrankungen aus konventionellen Adenomen nach der oben beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz entwickeln. Eine Minderheit von ungefähr 15% entsteht hingegen durch eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H) [43]. Hierbei kommt es durch eine, meist sporadisch erworbene, fehlgesteuerte Methylierung der *MLH1*-Promotorsequenz zu einem nachfolgenden „Gene Silencing“ des *MLH1*-Reparaturgens und anschließend häufig zu einem Verlust der DNA-Mismatch-Reparaturaktivität (mismatch repair deficiency, dMMR) [44-46]. Bei einer gleichzeitig bestehenden *BRAF* (v-Raf Murine Sarkoma Viral Oncogene

Homolog B1) Onkogen-Mutation kommt es zu einem hypermutablen prämaligen Phänotyp der kolorektalen Zellen [43]. Klinisch zeichnen sie sich durch charakteristische serratierte Adenome im proximalen Kolon aus [44].

1.1.3 Molekulare Marker für Prognose und Therapieansprechen

Initial sollte vor der Therapieeinleitung neben der UICC Stadieneinteilung auch eine molekularpathologische Diagnostik des Tumors erfolgen, da eine Reihe von molekularen Faktoren entscheidende prädiktive Informationen hinsichtlich Prognose und Therapieansprechen liefern. Die molekularpathologische Charakterisierung umfasst hierbei die Analyse des Mutationszustandes des *RAS*-Gens (rat sarcoma), des *BRAF*-Gens sowie den Status der Mikrosatellitenstabilität [5].

RAS-Mutationen sind in etwa 50% der metastasierten KRK nachweisbar und haben einen direkten Einfluss auf das Therapieansprechen [47]. Die intakte Signalübertragung der *RAS*-Proteine ist die Voraussetzung für die Wirksamkeit der Anti-EGFR-Antikörper Panitumumab und Cetuximab. Studien konnten zeigen, dass das Vorliegen von *RAS*-Mutation nicht nur mit einer Resistenz gegen Anti-EGFR-Antikörper verbunden ist, sondern deren Zugabe zu einer FOLFOX-Chemotherapie sogar zu einem ungünstigeren Therapieergebnis führt als eine alleinige FOLFOX-Chemotherapie [48, 49]. Hingegen bringt bei definierten *RAS*-Mutationen die Kombination aus Bevacizumab und Chemotherapie einen signifikanten Therapievorteil und wird regelhaft in der Erstlinientherapie eingesetzt [50].

In ca. einem Zehntel der metastasierten KRK werden aktivierende Mutationen im *BRAF*-Gen beschrieben. Diese sind häufig kombiniert mit einer MSI-H und besitzen auf Grund von hohen Raten an peritonealen und lymphogenen Metastasen eine schlechte Prognose [51]. Nachdem in Phase-III-Studien nachgewiesen wurde, dass die Kombinationstherapie mit dem *BRAF*-Inhibitor Encorafenib und dem EGFR-Inhibitor Cetuximab bessere Behandlungsergebnisse im Vergleich zur Standardchemotherapie bei weniger

Nebenwirkungen bringt, wurde anschließend die Kombinationstherapie als Erstlinientherapie bei metastasierten und *BRAF* mutierten KRK zugelassen [52].

Ebenso wurde nach positiven Studienergebnissen der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab als Monotherapie in der Erstlinie für Patienten mit metastasiertem KRK und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H) oder Defekt der DNA-Mismatch-Reparaturaktivität anerkannt [53].

1.1.4 Stadieneinteilung und Therapieschema des KRK

Die optimale Behandlungsstrategie des KRK ergibt sich aus dem Allgemeinzustand des Patienten, der Krankheitsausdehnung nach dem UICC-Stadium sowie der Molekularpathologie des Tumors und ist abhängig von der Resektabilität des Primarius und seiner Metastasen potenziell in jedem Tumorstadium kurativ [5, 54]. Wird in einem frühen Tumorstadium UICC-I (T1-2, N0, M0) der Tumor durch eine radikale Resektion vollständig entfernt, ist dies als alleinige Behandlungsmaßnahme ausreichend und eine adjuvante medikamentöse Therapie bringt prognostisch keinen Vorteil und wird entsprechend nicht empfohlen [55]. Eine 5-Fluorouracil (5FU) und häufig mit Oxaliplatin eskalierte adjuvante Chemotherapie wird in den UICC-Stadien III (T1-4, N>1, M0) und IV (T1-4, N>1, M>1) sowie in klinisch risikobehafteten Konstellationen auch im UICC-II Stadium (T1-4, N0, M0) eingesetzt. Zusätzlich kann bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen zur Verkleinerung des Tumors eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder eine Kurzzeit-Radiotherapie erfolgen [4, 5].

1.2 Das Tumorsuppressorprotein p53

Für die normale Zellfunktion in einem gesunden Organismus ist die Integrität des Erbguts eine Grundvoraussetzung. Die Zellen sind so programmiert, dass sie auch unter Stressbedingungen durch anpassungsfähige Mechanismen in der Lage sind ihre Erbinformation zu schützen [56]. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird auf Grund seiner außerordentlichen Funktion in diesem Schutzmechanismus als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [57]. Die Bezeichnung für p53 ergab sich aus der Molekülmasse von 53 kDa und wurde 1979 als erster entdeckter Tumorsuppressor dokumentiert [58].

1.2.1 Aktivierung von p53

Zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität ist eine Reaktionsfähigkeit der Zelle auf verschiedene äußere und innere Stressfaktoren unabdingbar. P53 nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein und leitet, als Reaktion auf die jeweiligen Stressreize, das weiterführende Schicksal der Zelle ein. Daher steht das p53-Netzwerk mit seiner komplexen Funktionsweise und Aktivierungskaskade seit Jahren im Zentrum der Tumorforschung [59]. Neben direkten Schädigungen der DNA oder fehlregulierten Replikationsprozessen resultieren auch weitere Stresssignale, wie hyperproliferative Einflüsse durch Onkogenaktivierung, Hypoxie oder Nährstoffmangel in einer Aktivierung von p53 und nachfolgender Initiierung des p53-Signalnetzwerkes. [60].

1.2.2 Funktionen von p53

Zum Schutz des Erbguts und des Organismus vor den beschriebenen Zellstressoren besitzt p53 ein breites Interaktions- und Funktionsspektrum, um entsprechende zelluläre Reaktionsmechanismen einzuleiten. Als eine der bedeutendsten tumorsuppressiven Mechanismen von aktiviertem p53 gilt die Möglichkeit durch die zentrale DNA-Bindungsdomäne als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Expression von spezifischen Effektorgenen zu regulieren. Vor allem Gene des Zellzyklus (*Reprimo*, *p21*) und der Apoptoseregulation (*Puma*,

Bax, *Apaf-1*, *NOXA*) können durch ihre p53-spezifischen Promotorsequenzen aktiviert werden [61, 62].

Neben der Transaktivierungsfunktion wirkt p53 im Zellkern auch als Transkriptionsrepressor. Dies geschieht einerseits, indem es mit zahlreichen Transkriptionsgenen interferiert und beispielsweise die Funktion von DNA-bindenden Transkriptionsaktivatoren beeinträchtigt oder andererseits indem es direkt Veränderung der Chromatinstruktur bestimmter DNA-Abschnitte initiiert, sodass die Transkription wachstumsfördernder Gene gehemmt wird [63].

Darüber hinaus liegen Erkenntnisse vor, dass zusätzlich zur komplexen Funktion als nuklearer Transkriptionsfaktor, p53 auch transkriptionsunabhängige Mechanismen zur Tumorsuppression fördert [64].

Zellzyklusarrest

Als eine der ersten Auswirkungen einer erhöhten Expression von p53 kommt es bei potenziell reversiblen DNA-Schädigungen zu einem vorübergehenden Zellzyklusarrest. Durch die Transaktivierungsfunktion von stimuliertem p53 sorgt dieses dabei für die gesteigerte Expression von *p21*, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase CDK1 und CDK2, wodurch ein reversibler Arrest der betroffenen Zelle in der G₁- Phase stattfindet. Bei geringen Schäden am Erbgut kann die resultierende Blockade zur Reparatur der beschädigten DNA-Abschnitte genutzt werden [65].

Apoptose

Bei irreparablen genomischen Schäden wird die betroffene Zelle zum Schutz des Gesamtorganismus durch einen p53-vermittelten und kontrollierten Zelluntergang, genannt Apoptose eliminiert [66]. Bei der Initiierung dieser programmierten Signalkaskade spielt p53 erneut als Transkriptionsfaktor im Zellkern eine zentrale Rolle und sorgt für die Aktivierung von zahlreichen p53-responsiven Zielgenen. Unter diesen proapoptotischen Zielgenen befinden sich unter anderem *Apaf1* („apoptotic peptidase activating factor 1“), *Bax* („BCL-2-

associated X protein“), *PUMA* („p53 upregulated modulator of apoptosis“), *PIDD* („p53-induced death domain protein“), *PIG-3* („p53 inducible gene 3“) und *NOXA* welche alle eine p53-Bindungsdomäne in ihrer Promotorsequenz aufweisen und direkt durch p53 heraufreguliert werden können [60]. Durch diese vielfältigen Transkriptionsprozesse kommt es in der Folge zur Einleitung einer komplexen Apoptosekaskade und dem kontrollierten Abbau der entartungsgefährdeten Zelle [67].

1.2.3 Die Rolle von p53 in Tumorerkrankungen

Wie oben beschrieben ist ein funktionierendes p53-Netzwerk integraler Bestandteil der Zellhomöostase und besitzt existenziellen Einfluss bei der Prävention von Tumorentstehung. Kommt es zu einem Ausfall von p53 hat dies erheblichen Einfluss auf die Zelle und kann fatale Folgen für den Organismus haben. Damit sich Tumorzellen erst entwickeln können, stellt die Überwindung der p53-abhängigen Apoptoseinduktion ein universelles Ereignis für Tumorzellwachstum dar [61]. Das *p53*-Gen ist hierbei das am häufigsten veränderte Einzelgen bei menschlichen Krebserkrankungen und in mehr als 50% aller invasiven Tumoren nachweisbar [68]. Am häufigsten treten Missense-Mutationen mit Veränderungen der DNA-Bindungsdomäne auf, wodurch die Transkriptionsfähigkeit von p53 herabgesetzt ist [69]. Durch Ausschaltung der p53-medierten Apoptoseregulation besteht in der Folge eine gesteigerte Anfälligkeit für zelluläre Entartungsprozesse sowie ein reduziertes Therapieansprechen in einer Vielzahl von Tumoren [70-72]. Jedoch konnten auch in Tumoren mit erhaltener p53-Funktion alternative Vorgänge identifiziert werden, die ebenfalls zu einer Verminderung der p53-Aktivität führen [61, 73]. Einer dieser alternativen Mechanismen der Inaktivierung des p53-Signalweges, dem eine essenzielle Bedeutung im Regulationsmechanismus von p53 zugeschrieben wird, sind die Apoptose stimulierenden Proteine von p53, kurz ASPP.

1.3 Die Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP)

Auf der Suche nach alternativen Regulationsmechanismen für die Steuerung des p53-Signalnetzwerks, richtete sich der Fokus unserer Forschungsgruppe auf die Proteinfamilie der ASPP. Gerade in Tumoren, ohne eine *p53*-Genmutation drängte sich die Frage auf, ob alternative Modulatoren der Apoptose in diesen Fällen fehlreguliert sind.

Durch Regulation der p53-abhängigen Transkriptionsinduktion proapoptotischer Effektorgene besitzen speziell die ASPP eine essenzielle Rolle im p53-Netzwerk. Eine Deregulation dieser Proteine könnte, selbst bei funktionsfähigem p53, zu einer partiellen Inaktivierung des Apoptosesignalwegs führen und hätte damit erheblichen Einfluss auf die ersten Schritte der Tumorentstehung [74].

1.3.1 Mitglieder der ASPP

Die Familie der ASPP besteht aus drei Mitgliedern: den beiden proapoptotischen Proteinen ASPP1 und ASPP2 sowie dem anti-apoptotische Gegenspieler (inhibitory) iASPP. Die ASPP-Proteinfamilie zeichnet sich durch einen evolutionär konservierten C-Terminus aus, der vier repetitive Ankyrin-Sequenzen, eine SH3-Domäne und eine prolinreiche Region beinhaltet (Abbildung 3) [75, 76]. Dieser C-Terminus ist die bevorzugte Bindungsstelle der ASPP Proteine mit ihren Interaktionspartnern, insbesondere dem Tumorsuppressorprotein p53 [77].

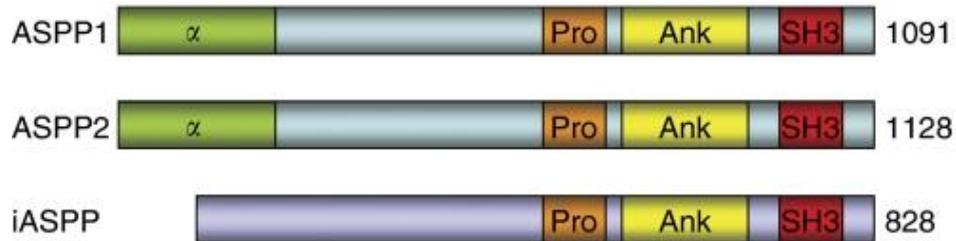


Abbildung 3: Struktur der ASPP-Familie. Darstellung der Strukturgleichheiten der ASPP-Familie mit gemeinsamer prolinreicher Region (Pro), Ankyrin-Wiederholungen (Ank) und einer SH3-Domäne. Abbildung aus [75].

Die bisher bekannteste Funktion der ASPP-Proteinfamilie ist die Regulierung der durch p53 und seinen Familienmitglieder p63 und p73 vermittelten Apoptose [78]. Bei Auftreten von zellulärem Stress kommt es zur Expression und Stabilisierung von p53 und konsekutiv entweder zum Zellzyklusarrest oder der Induktion von Apoptose. Die Bindung von ASPP1 und ASPP2 an p53 führt spezifisch zu einer erhöhten Affinität der DNA-Bindungsdomäne von p53 für proapoptotische Promotorregionen an Genen wie *Bax* und *PIG3*, jedoch nicht zu einer erhöhten Affinität für die Promotoren der Gene für Zellzyklusarrest *CDK1A* oder *MDM2*. Durch die nachfolgend vermehrte Transkription von proapoptotischen Genen kommt es daher zur Einleitung der Apoptose (Abbildung 4) [74, 79, 80].

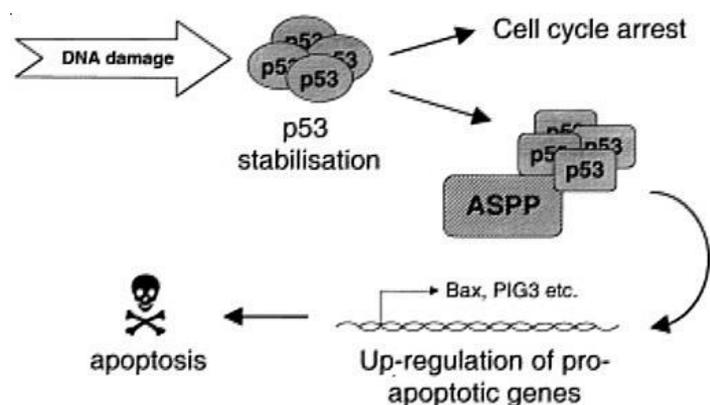


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptoseinduktion durch ASPP1/2 und p53 Interaktion. Abbildung aus [79].

Bei Überexpression von iASPP wird die Bindung von ASPP1 und ASPP2 an p53 verhindert und es kann auf diesem Weg keine Induktion der Apoptose erfolgen (Abbildung 5). Diese Eigenschaft der Hemmung von p53, macht iASPP zu einem Onkoprotein und Gegenspieler von ASPP1 und ASPP2 [81].

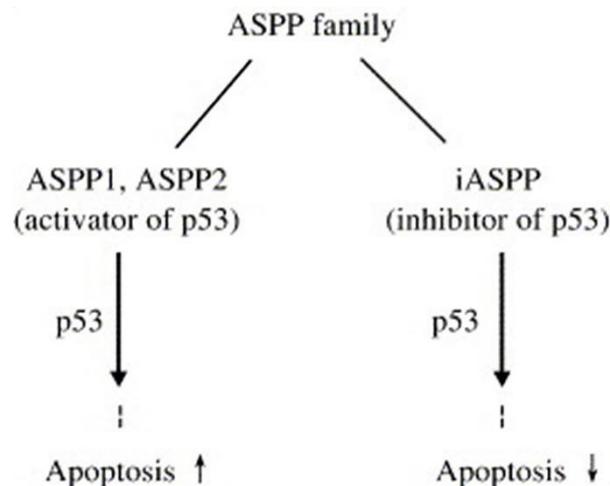


Abbildung 5: Regulation der p53-abhängigen Apoptose durch die ASPP Mitglieder.
Abbildung aus [82].

Obwohl vermutet werden könnte, dass besonders in p53 Wildtyp (WT) Tumoren die ASPP-Proteine ein logisches Ziel für Mutationen sein müssten, zeigten genomische Analysen der *ASPP*-Gene keine relevanten genetischen Veränderungen [83, 84]. Interessanterweise konnte dennoch in einer Vielzahl von humanen Tumoren eine deregulierte Expression der ASPP-Familie nachgewiesen werden [74, 75, 85-88]. So konnte beispielsweise unsere Arbeitsgruppe eine verminderte Expression für ASPP2 auf Grund einer Hypermethylierung im Bereich der Promotorregion nachweisen [87].

Neben dem besseren Verständnis der Tumorphathogenese liefern ASPP-Screenings auch neue Erkenntnisse über Prognose und Therapieansprechen. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen mit einem hohen Expressionslevel für ASPP1 und ASPP2 besser auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika ansprechen als Zellen mit niedriger Expression [87, 89].

1.3.2 ASPP2

Das Apoptose stimulierende Protein von p53-2 (ASPP2), oder auch 53BP2L, kodiert durch das Gen *TP53BP2*, ist ein wichtiges Mitglied der Familie der ASPP-Proteinfamilie [90]. Alle Mitglieder dieser Familie zeichnet repetitive Ankyrin-Sequenzen, eine SH3-Domäne sowie eine prolinreiche Sequenz an ihrem C-Terminus aus [74, 91, 92]. Im Jahr 1994 entdeckten Iwabuchi et al. den C-Terminus von ASPP2, den sie ursprünglich 53BP2 nannten [91]. Später konnte nachgewiesen werden, dass die 53BP2-Bindungsstelle in der p53-Kerndomäne aus einer evolutionär konservierten Region besteht und dass die bei menschlichen Krebsarten gefundenen p53-„Hotspot“-Mutationen die 53BP2/p53-Interaktion stören [77, 93, 94]. Dies deutete darauf hin, dass Wechselbeziehungen zwischen beiden Proteinen eine wichtige Rolle für die p53-Funktion spielen. Im Jahr 1996 entdeckten Naumovski und Cleary eine längere Version von 53BP2 mit 1005 Aminosäuren und einer Bindungsfunktion an Bcl-2 und bezeichneten es Bbp (Bcl-2 Bindungsprotein). Dieses Protein führte bei einer Überexpression zur Hemmung des Zellwachstums [95]. In der Folge konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass Bbp/ 53BP2 das Zellwachstum inhibiert und die Apoptose stimuliert [96, 97]. Im Jahr 2001 zeigten Samuels-Lev et al., dass 53BP2 und Bbp beide Fragmente eines längeren Proteins sind, welches sie ASPP2 nannten [74]. ASPP2 und Bbp/ 53BP2 sind demnach Spleißisoformen, die aus 1128 Aminosäuren bestehen und vom demselben Genabschnitt kodiert werden [92]. Neben der Beschreibung dieser langen Version zeigten weitere Versuche, dass ASPP2 nur in voller Länge und bei intakter p53-Kerndomäne optimal Apoptose auslösen kann, während die kürzeren Varianten nur eingeschränkt dazu in der Lage sind [74]. Die Expression von ASPP2 verstärkt außerdem die apoptotische Funktion von p63 und p73, indem es selektiv die Expression endogener p53-Zielgene, wie *PIG3* und *PUMA* induziert. Daher ist ASPP2 ein Aktivator mehrerer p53-Familienmitglieder und die genannten Interaktionsmöglichkeiten deuten auf die zentrale Rolle im p53-Netzwerk hin [78].

Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die ASPP2-Expression bei einer Vielzahl menschlicher Tumoren regelhaft verändert ist und mit Therapieresistenzen und einem schlechteren klinischen Verlauf der Patienten assoziiert ist [74, 83, 87, 98-101].

In diesem Rahmen konnten Kampa et al. nachweisen, dass ASPP2 ein *in vivo* Tumorsuppressor ist. So waren untersuchte ASPP2^{-/-} Mäuse auf Grund eines frühen embryonalen Ereignisses nicht überlebensfähig. Obwohl sich ASPP2^{+/-} Mäuse phänotypisch unauffällig zeigten, waren sie signifikant tumoranfälliger als ASPP2 WT Mäuse und wiesen mit zunehmendem Lebensalter eine erhöhte Inzidenz spontaner Tumoren auf. Darüber hinaus entwickelten γ -bestrahlte ASPP2^{+/-} Mäuse im Vergleich zu ASPP2^{+/+} deutlich häufiger ein hochgradiges T-Zell-Lymphom [102].

Mit jeder Studie wird die Komplexität des funktionellen Spektrums von ASPP2 ersichtlicher. ASPP2 fördert nicht nur die p53 vermittelte Apoptose nach Zellstress oder DNA-Zerstörung, sondern hat offensichtlich auch weitere, gegebenenfalls p53 unabhängige Funktionen wie Inhibierung des Zellwachstums sowie Beeinflussung der Gene des Zellzyklus, der Autophagie und vieler weiterer Signalwege [75, 83, 90, 102-105]. All diese Erkenntnisse deuten auf ein sehr komplexes Funktionsspektrum von ASPP2 hin, dessen zentrale Rolle in der Tumorentstehung und Therapieresistenz weiter Gegenstand der aktuellen Forschung ist.

1.3.3 ASPP2 κ

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der ASPP2-Fehlregulation, insbesondere in p53 WT Tumoren zu verstehen, wurde in unserem Labor das ASPP2-Gen auf genomische Veränderungen hin untersucht. Wie bereits erwähnt, wurden interessanterweise keine relevanten Mutationen gefunden. Anstelle dieser wurde, zunächst in akuten Leukämien, eine am C-Terminus trunke Spleißvariante von ASPP2, genannt ASPP2 κ (ASPP2 κ) entdeckt. Mittels mRNA-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass dieser Spleißvariante Exon 17 fehlt. Durch den Exon-Verlust verschiebt sich das

Leseraster und es resultiert ein verfrühter Stopp der Translation. Dies führt dazu, dass der größte Teil des C-Terminus, welcher die p53-Bindungsstelle enthält, trunkiert wird und fehlt (Abbildung 6). Dass diese Spleißvariante auch tatsächlich in ein Protein translatiert wird, wurde mittels in unserer Arbeitsgruppe eigens entwickelten isoformen Antikörpern im Co-Immunpräzipitationsverfahren nachgewiesen. In zunächst funktionellen Beobachtungen konnte dargestellt werden, dass betroffene Zellen ein gesteigertes Proliferations- und reduziertes Apoptoseverhalten aufzeigen. Durch diese Forschungsergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass bedingt durch eine gestörte Interaktion zwischen ASPP2k und p53 vermehrt Mutationen in einer Zelle akkumulieren und Tumorentstehung begünstigt wird [84, 106].

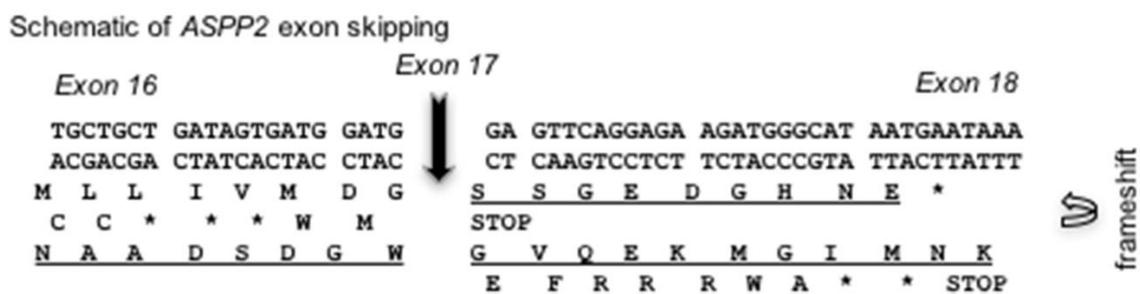


Abbildung 6: Das Fehlen von Exon 17 führt zu einem früheren Translationsstopp mit trunkiertem C-Terminus. Abbildung aus [84].

Weiter wurde gezeigt, dass 30- 50% der Leukämiepatienten sowie Rhabdomyosarkompatientenproben ASPP2k exprimieren und ASPP2k funktionell aktiv ist. Zuletzt konnte in *in vitro* Zellmodellen herausgefunden werden, dass die Expression von ASPP2k stressinduzierbar ist und ASPP2k die Sensibilität gegenüber Chemotherapie sowie die Zellproliferation beeinflusst [84, 101].

Zusammenfassend wurde von Schittenhelm et al. eine neue dynamische Spleißvariante von ASPP2 mit onkogenem Potenzial beschrieben, die neben Leukämien auch in einer Reihe anderer Tumoren zu detektieren ist [84, 101].

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität von kolorektalen Karzinomen ist ein weiteres Verständnis der Tumorgenese und die Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten eine wichtige Herausforderung für die Zukunft [2, 3, 6].

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass nur 40– 50% der Patienten mit KRK p53-Mutationen aufweisen, weshalb auch hier die Suche nach alternativen inaktivierenden Mechanismen der p53-induzierten Apoptose angezeigt ist [11].

Die hier vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Rolle von ASPP2k beim KRK systematisch zu erforschen. Für den *in vivo* Nachweis von ASPP2k im KRK wurden die mRNA-Level von ASPP2k in Patientenproben quantifiziert und mit den RNA-Level aus gesundem Gewebe verglichen. Um weiter die funktionelle Aktivität von ASPP2k im KRK zu untersuchen, wurden ASPP2k überexprimierende und supprimierende Modelle in zwei unabhängigen isogenen KRK-Zelllinien, jeweils mit TP53 WT Hintergrund, etabliert. In diesen Modellen wurde der Einfluss von ASPP2k auf die Proliferation, die Apoptose und die Migration der kolorektalen Karzinomzellen untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit wurden am 05. November 2021 im Fachjournal *Frontiers in Molecular Bioscience* veröffentlicht und können die Grundlage für eine verbesserte Diagnostik und Prognoseabschätzung, sowie langfristig die Möglichkeit für eine neuartige, zielgerichtete Tumorthherapie beim KRK darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

12-Lochplatte (Corning® CellBIND® 12 well plates)	Corning Incorporated
6-Lochplatte (Corning® Costar® Transwell™ permeable Supports)	Corning Incorporated
6-Lochplatten (Corning® CellBIND® 6 well plates)	Corning Incorporated
96-Well-PCR-Platte (FrameStar® 480)	Genaxxon
Dichtungshafffolie 96-Well-PCR-Platte	Genaxxon
Einweg-Skalpell (B Braun™ Aesculap™ CUTFIX)	B Braun
Eppendorf Tubes® (Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml)	3810X Eppendorf
FACS-Röhrchen (BD Falcon™ Round-Bottom Tubes)	BD Falcon™
Falcon-Röhrchen (BD Falcon™ Conical Tubes; 15ml, 50ml)	BD Falcon™
Glaspipetten (2,5ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	BD Falcon™
Handschuhe (unsteril)	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen (CryoTube™ Vials)	Thermo Scientific

Kulturflaschen, belüftet (250ml/75cm ² , 70ml/25cm ²)	BD Falcon™
Pipetten (verstellbar 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Nerbe Plus
RNeasy spin column	Quiagen

2.1.2 Geräte

Absaugsystem Vacusafe	Integra
Begasungsbrutschrank (HERAcell 240i CO ₂)	Thermo Scientific
Deckglas 22 x 22 mm	Menzel
FACS Calibur	Becton Dickinson
- Angeschlossene Hardware	Apple
- Auswertungssoftware Cell Quest	Becton Dickinson
Fotomikroskop (Nikon Eclipse TS100)	Nikon
- Fluoreszenz (Nikon Intensilight C-HGFI)	Nikon
- Auswertungssoftware NIS Elements	Nikon
Kühlschrank 6°C	Liebherr
LightCycler® 480	Roche
Mikroskop (Olympus IX51)	Olympus
Mini-Zentrifuge (ROTILABO®)	Carl Roth
Zählkammer nach Neubauer	Hecht Assistent

Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences
Schüttler	GFL
Sicherheitswerkbank (HERAsafe)	Thermo Scientific
Spectrophotometer (NanoDrop™ 2000)	Thermo Fischer
ThermoCycler (Mastercycler® gradient)	Eppendorf
Vortexer	
- Reax top	Heidolph
- Vortexer Genie 2	Scientific industries
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugen	
- Varifuge 3.0 ORS	Heraeus
- Centrifuge 5415R	Eppendorf

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

0,05% Trypsin/ EDTA	Biochrom
10x Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences
7- Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences
Allophycocyanin (APC) -Annexin V	BD Biosciences
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (EMSURE®)	Merck Milipore
FACS-Flow	BD Biosciences

Festales Kälberserum (fetal bovine serum FBS)	Gibco
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -Annexin V	BD Biosciences
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck Millipore
HBSS (Hank`s Balanced Salt Solution)	Gibco
Hyclone-Dulbecco´s Minimum Essentials Kulturmedium (DMEM)	Gibco
HyClone-McCoy´s 5A Medium	Gibco
L- Glutamin (200 mM)	Thermo Fischer
LB Broth Medium	Invitrogen
McCoy´s 5A modified Medium	Gibco
Natrium-Pyruvat	Life Technologies
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom
Polybrene	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (PI)	Life Technologie
Puromycin (#3812)	Gibco
Zeocin™	Thermo Fischer

2.1.4 Primer

18s vorwärts	5'-ATCCCTGAAAAGTTC-3'	Eurofins
18s rückwärts	5'-CACACCCTTAATGGC-3'	Eurofins
ASPP2k vorwärts	5'-CTGCTGATAGTGATGGATGGAG-3'	Eurofins
ASPP2k rückwärts	5'-CCCAAAGCGCATAAATGACT-3'	Eurofins

2.1.5 Probes

18s	Universal ProbeLibrary Probe #70	Roche
ASPP2k	Universal ProbeLibrary Probe #02	Roche

2.1.6 Reagenzien-Kits

dNTPs		Thermo Fischer
LightCycler Master® 480 SYBR Green I Master Kit		Roche
Lipofectamine 2000		Invitrogen
OPTI-MEM® Medium		Gibco
Packaging Plasmid Mix		Dharmacon
pcDNA4/HisMax®/LacZ Vektor		Invitrogen
pcDNA4/HisMax®-TOPO®/LacZ Vektor		Invitrogen
pGFP-C-shLenti Vektor		Origene

PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fischer
Random Primers	Invitrogen
Reverse Transkriptase Puffer	Roche
RLT Plus Lyse Puffer	Qiagen
RNase Inhibitor	Roche
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Transcriptor Reverse Transcriptase Kit	Roche
Trans-Lentiviral packaging mix	Dharmacon

2.2 Zelllinien

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp und Zelleigenschaften	Bezug/ Referenz
DLD-1 p53 ^{+/-}	Humane Dukes`C Typ Adenokarzinom Zellen (KRK mit Lymphknotenmetastasen) mit p53 Wildtypstatus	Dr. Vogelstein, John-Hopkins-Universität, Baltimore, MD; [107, 108]
HCT-116 p53 WT	Humane kolorektale Karzinomzellen	Dr. Vogelstein, John-Hopkins-Universität, Baltimore, MD; [109, 110]
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen, Expression des „SV40 large T-Antigens“, für Transfektion geeignet	DSMZ*; [111]

*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

2.3 Patientenkollektiv

Als Zellmaterial für diese Arbeit wurde jeweils eine Tumorbiospie und als Kontrolle eine Probe mit gesundem kolorektalem Gewebe von 15 Patienten mit Erstdiagnose eines kolorektalen Karzinoms asserviert. Nach individueller Aufklärung über die Konservierung und wissenschaftliche Verwendung des Zellgewebes wurde die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt und die Proben vom Comprehensive Cancer Center Tübingen-Stuttgart für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine Genehmigung für das vorliegende Forschungsprojekt liegt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen vor (Projektnummer: 188/2018BO2).

Tabelle 2: Patientenproben

Pat-ID	Alter (Jahre)	Geschlecht	Histologischer Subtyp	Grading	Tumorgröße (cm)	Tumoralokalisation	Tumorstadium	Microsatellitenstabilität	RAS/RAF Mutation	TP53 Status
C1	68	männlich	Adenokarzinom	G3	9,2 x 6,2 x 2,7	Flexura. coli sinistra	pT4bN1aM0	instabil	KRAS	WT
C2	62	männlich	Adenokarzinom	G2	k.A.	k.A.	pTxN1bM1b	stabil	k.A.	k.A.
C3	53	weiblich	Adenokarzinom	G2	6,2 x 5,1 x 2,3	C. ascendens	pT3N2aM0	stabil	k.A.	k.A.
C4	83	männlich	Adenokarzinom	G2	3,5 Ø	C. ascendens	pT3N1bM0	k.A.	k.A.	k.A.
C5	63	weiblich	Adenokarzinom	G2	1,9 x 1,5 x 0,6	C. sigmoideum	pT3N1aM0	stabil	BRAF	k.A.
C6	77	weiblich	Adenokarzinom	G2	5,5 x 4,9 x 3,2	Caecum	pT2N0M1a	k.A.	k.A.	k.A.
C7	65	männlich	Adenokarzinom	G3	5 x 4	C. ascendens	pT3N1bM0	k.A.	k.A.	k.A.
C8	60	weiblich	Adenokarzinom	G2	5 x 3 x 2	C. ascendens	pT2N0M0	stabil	k.A.	k.A.
C9	77	weiblich	Adenokarzinom	G2	11,5 Ø	C. ascendens	pT3N0M0	stabil	k.A.	k.A.
C10	69	männlich	Adenokarzinom	G3	15,3 x 5,3 x 2,5	C. descendens	pT4aN2bM0; R1	k.A.	BRAF	p.G245S
C11	79	männlich	Adenokarzinom	G2	6 Ø	Kolorektal	pT3N0M0	stabil	k.A.	k.A.
C12	65	weiblich	Adenokarzinom	G2	7 Ø	Kolorektal	pT3N1aM1a	stabil	KRAS	p.G266V
C13	65	männlich	Adenokarzinom	G2	3,5 x 2,3	k.A.	pT4aN1bM0	stabil	BRAF	WT
C14	85	weiblich	Adenokarzinom	G2	4,2 x 3,2 x 1	k.A.	pT3N2bM0	stabil	k.A.	k.A.
C15	k.A.	k.A.	Adenokarzinom	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

2.4 Zellkultivierung

Die beiden kolorektalen Zelllinien wurden in 10ml McCoy's 5A-Kulturmedium nach Zugabe von 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FBS), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml), 1% (v/v) Natrium-Pyruvat und 1% nicht-essentieller Aminosäuren (NEAA) kultiviert. Für die virale Transduktion wurden HEK293T Zellen in Hyclone-Dulbecco's Minimum Essentials (Hyclone-DMEM) Kulturmedium, welches mit 10% FBS und 200µM L-Glutaminen versetzt wurde, kultiviert. Alle Zellen wurden in belüfteten Zellkulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂- und H₂O-Gehalt aufbewahrt. Die Zellkulturen wurden alle 2-3 Tage, in Abhängigkeit ihrer Verdopplungszeit und bei einer Zelldichte von 80- 90%, im Verhältnis 1:5 oder 1:10 verdünnt und neu kultiviert. Die adhärennten Zellen wurden hierfür mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 2,5ml 0,05% Trypsin bis zur Ablösung inkubiert.

2.5 Zellkryokonservierung und Auftauen

Zur Etablierung eines Zellvorrats wurden nicht benötigte Zellen kryokonserviert. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die Zellsuspension anschließend bei 1200U/min für 5min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet mit 1ml Konservierungsmedium, bestehend aus 50% McCoy's 5A-Kulturmedium, 40% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein Konservierungsröhrchen gegeben und in einem Kryokonservierungscontainer über 24h langsam auf -80°C gekühlt und zur langfristigen Aufbewahrung in einem -80°C Gefrierschrank gelagert.

Um konservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese nach zügigem Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad zusammen mit 5ml Kulturmedium in ein 15ml Falcon-Röhrchen gegeben. Dieses wurde 5min bei 1200U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das übrige Zellpellet mit

20% FBS-Kulturmedium resuspendiert sowie anschließend im Brutschrank kultiviert.

2.6 Erstellung von ASPP2k überexprimierenden Zellen

Um die *in vitro* Auswirkungen von ASPP2k untersuchen zu können, wurden zwei ASPP2k knock-in Zellmodelle etabliert. Für die Erstellung von dauerhaft ASPP2k überexprimierenden Zellen wurde ein spezieller Plasmid-DNA Vektor angefertigt, welcher neben der Gensequenz für das Protein ASPP2k auch zwei Gensequenzen für Antibiotikaresistenzen enthielt. Zum Vergleich wurde ein Plasmid-DNA Vektor mit einer leeren DNA-Sequenz (Empty-Vektor Kontrolle, EV) anstatt der ASPP2k DNA-Sequenz erstellt. Für eine spätere Selektion der erfolgreich modifizierten Zellen enthielt die Plasmid-DNA einen DNA-Genabschnitt, welcher für eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und Phleomycin D1 (Zeocin®) kodiert.

2.6.1 Transformation von ASPP2k knock-in DNA-Plasmiden in Bakterien und Plasmidisolation

Mit Hilfe des High Efficiency Transformation Protokolls (BioLabs®) wurde der ASPP2k knock-in Plasmid-DNA Vektor pcDNA4/HisMax®-TOPO®/LacZ bzw. der EV Plasmid-DNA Vektor pcDNA4/HisMax®/LacZ jeweils in *E. coli* Bakterien transformiert. Anschließend wurde die gesamte Transformationssuspension auf eine Selektionsplatte mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erhielt man einzelne Bakterienkolonien, welche erfolgreich transformiert wurden.

Zur Amplifizierung der transformierten *E. coli* Bakterien wurden diese in einem Erlenmeyerkolben mit 3ml 2x LB-Broth Medium mit Ampicillin 100µg/ml gelöst und für 12-16 Stunden (h) bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Mittels des PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit wurde die Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli* Bakterien isoliert. Die gewonnene Plasmid-DNA

wurde anschließend mit einem Spektralphotometer auf Qualität und Quantität geprüft.

2.6.2 Transfektion von ASPP2k knock-in DNA-Plasmid in kolorektale Tumorzellen

Um eine dauerhafte Überexpression von ASPP2k zu erreichen, wurde in 2 Wells einer 6-Well-Platte DLD-1 p53^{+/+} Zellen vorgelegt und die Zellen am Folgetag bei einer Zelldichte von 80% transfiziert. Hierzu wurde mittels dem Lipofectamine® 2000 DNA Transfektions Protokoll (Thermo Fischer) 14µg ASPP2k knock-in bzw. EV-Kontroll- Plasmid-DNA zusammen mit 9µl Lipofectamine® 2000 und OPTI-MEM® Medium auf die DLD-1 p53^{+/+} Zellen gegeben und für 3 Tage bei 37°C inkubiert.

2.6.3 Selektion und Transfektionskontrolle der ASPP2k knock-in Zellen

Um die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren, wurde eine 5- tägige Behandlung der Zellen mit Phleomycin D1 (Zeocin®) durchgeführt. Hierfür wurden die transfizierten ASPP2k knock-in und EV-Zellen in je 3 Wells einer 6-Well-Platte überführt und am darauffolgenden Tag mit 100µg/ml, 200µg/ml und 300µg/ml Zeocin® behandelt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und die selektierten Zellen nach 200µg/ml Zeocin® Behandlung expandiert und für weitere Versuche in Zellkultur genommen.

Eine anschließende Verifikation des ASPP2k knock-in erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR).

2.7 Erstellung von ASPP2k herunterregulierten Zellen

Um einen vollständigeren Einblick in die *in vitro* Auswirkungen von ASPP2k zu erlangen, wurden ASPP2k knock-down Zellmodelle erstellt. Hierfür wurde ein spezieller Plasmid-DNA Vektor angefertigt, welcher neben einer short-hairpin RNA (shRNA) mit ASPP2k- bzw. EV-Sequenz zwei Genabschnitte mit einer Resistenz gegen die Antibiotika Chloramphenicol und Puromycin enthielt.

2.7.1 Transformation von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in Bakterien und Plasmidisolation

Für die Transformation des DNA-Plasmids in *E. coli* Bakterien wurde das High Efficiency Transformation Protokoll (BioLabs®) und der pGFP-C-shLenti shRNA DNA-Plasmid Vektor verwendet. Dieser Vektor enthielt eine shRNA ASPP2k- bzw. EV-Kassette, eine Puromycin- und Chloramphenicol-Resistenz sowie eine tGFP-Sequenz. Nach abgeschlossener Transformation wurde die gesamte Transformationssuspension für eine Nacht bei 37°C auf eine Selektionsplatte mit Chloramphenicol gegeben. Nach erfolgter Inkubation und Selektion erhielt man einzelne erfolgreich transformierte Bakterienkolonien.

Zur Vervielfältigung der zuvor gewonnenen *E. coli* Bakterienkolonien, wurden diese in 3ml 2x LB-Broth Medium mit Chloramphenicol 25µg/ml gelöst und in einem Erlenmeyerkolben für 12-16h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli* Bakterien wurde das PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit verwendet und die Plasmid-DNA mittels eines Spektralphotometers auf Qualität und Quantität überprüft.

2.7.2 Transfektion von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in HEK293T Zellen und Produktion von Lentiviren

Zur Herstellung von Lentiviren für die spätere Transduktion der kolorektalen Zielzellen wurden HEK293T Zellen in 4 Wells einer 6-Well-Platte vorgelegt und am darauffolgenden Tag bei einer Zelldichte von 50% transfiziert. Hierfür wurde 6µg Plasmid-DNA der isolierten shASPP2k- bzw. EV-Kontroll- Vektoren

zusammen mit 4,3µl Trans-Lentiviral packaging mix, sterilem Wasser, 15µl Calciumchlorid (CaCl₂) und 150µl 2x HBSS gemischt und tröpfchenweise auf die HEK293T Zellen gegeben. Nach 12h Inkubation wurde das Medium entfernt und durch 2ml Serum Reduced Medium, bestehend aus HyClone-McCoy's 5A Medium, 2mM L-Glutamine, 5% FBS und 1x Penicillin/ Streptomycin, ersetzt. Die 6-Well-Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 48h bei 37°C inkubiert. Um die Lentiviren zu isolieren, wurde nach 24h das Medium der Wells gesammelt, zentrifugiert und mittels einem 0,45µm Filter filtriert.

2.7.3 Lentivirale Transduktion von ASPP2k knock-down DNA-Plasmiden in DLD-1 p53^{+/+} bzw. HCT-116 p53WT

Um eine dauerhafte Herunterregulierung von ASPP2k in DLD-1 p53^{+/+} bzw. HCT-116 p53WT zu erreichen, wurden beide Zelllinien je doppelt in einer 6-Well-Platte ausgelegt. Am Folgetag wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 60- 80% transduziert. Hierfür wurde je 200µl der shASPP2k- bzw. EV.shASPP2k- Lentiviren zusammen mit 1,6µl Polybrene auf die Zellen gegeben und für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch komplettes McCoy's 5A-Kulturmedium ersetzt.

2.7.4 Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen und Transduktionskontrolle

Durch eine 5- tägige Behandlung mit 1µg/ml Puromycin wurden die erfolgreich transduzierten Zellen selektiert und konnten anschließend expandiert und für darauffolgende Versuche in Zellkultur übernommen werden. Die zur Selektion erforderliche Puromycinkonzentration wurde zuvor mit einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Die Aufnahme des Plasmid-DNA Vektors wurde durch Nachweis des Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP (tGFP), überprüft und mittels qRT-PCR verifiziert.

2.8 Genexpressionsanalyse der Zelllinien mittels qRT-PCR

Für die Analyse des ASPP2k-Levels in den Zelllinien wurde eine Quantifizierung der ASPP2k mRNA- Expression durchgeführt. Hierfür wurde die RNA der Zellen mit Hilfe des RNeasy® Mini-Kits aus den Zellen extrahiert. Die RNA wurde mittels Reverse Transkriptase Kit in cDNA umgewandelt. Anschließend wurde mit dem Light Cycler 480 Probes Master Kit in einer qRT-PCR die Expression von ASPP2k im Verhältnis zur Expression des Haushaltsgens 18s ermittelt.

2.8.1 RNA Extraktion sowie Quantitäts- und Qualitätsbestimmung

Um ein Zellpellet zu erhalten, wurden die entsprechenden Zellen trypsiniert, in einem 15ml Röhrchen gesammelt und für 5min bei 1200U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 350µl RLT Plus Lyse Puffer gelöst und mit 350µl 70% Ethanol gemischt, wodurch die Zellstruktur aufgelöst und die gesamte RNA der Zellen extrahiert wurde. Das gesamte Volumen wurde auf ein RNeasy spin column gegeben und 30sek bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss mit allen nicht benötigten Anteilen der Zelle verworfen. Nach weiteren Reinigungsschritten wurde die RNA mit 500µl 80% Ethanol fixiert und mit 30µl RNase freiem Wasser in einem 1,5ml Sammelröhrchen gesammelt und bei -20°C gelagert.

Mit dem Spektralphotometer wurde abschließend die Reinheit und Menge der RNA bestimmt. Dies diente als Grundlage für die darauffolgende Umschreibung der RNA in cDNA.

2.8.2 cDNA Herstellung

Mit dem Enzym Reverse Transkriptase wurde mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aus der gewonnenen RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt.

Hierfür wurde 1µg RNA mit 2µl Random Primers versetzt und das Gemisch auf 26µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt und 10min bei 65°C inkubiert.

Danach wurden 12µl eines PCR-Mastermix, bestehend aus 8µl RT Puffer, 1µl RNase Inhibitor, 2µl dNTPs und 1µl RT, hinzugegeben und in einen Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert: 10min 25°C, 30min 55°C und 5min 85°C. Die erstellte cDNA wurde im Anschluss bei -20°C für die spätere Verwendung aufbewahrt.

2.8.3 Die Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR basiert und zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Während eines PCR-Zyklus wird die Quantifizierung in Echtzeit durch eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt. Dabei ist die Fluoreszenz-Messung proportional zur Menge der PCR-Produkte.

Im experimentellen Ansatz wurden 0,8µl Wasser, 2µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (7,5µmol), 0,2µl #70 Universal Probe für 18s bzw. #02 Universal Probe für ASPP2κ (0,75µmol) und 10µl 2x LC 480 MasterMix gemischt. Das gesamte Volumen wurde zu 5µl der entsprechenden cDNA gegeben. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt, wobei 18s als Referenzgen diente.

Das auf dem Light Cycler 480 vorinstallierte Programm „Mono Color Hydrolysis UPL“ wurde zur Quantifizierung genutzt und die Rohdaten mit Hilfe der LightCycler 480 Software analysiert. Um die Genexpression des Zielgens zu bestimmen, wurde die relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet.

2.9 Genexpressionsanalyse des Patientenmaterials mittels Zellyse und qRT-PCR

Für einen *in vivo* Nachweis von ASPP2k im KRK wurde das mRNA-Level von ASPP2k in kolorektalen Karzinomgewebeproben von Patienten quantifiziert und mit dem mRNA-Level aus gesundem kolorektalen Gewebe verglichen.

Hierfür wurden die Gewebeproben auf Eis gelagert und mit einem Skalpell in dünne Scheiben geschnitten. Das Gewebe wurde mit Hilfe des Skalpells weiter homogenisiert und mit 600µl RLT Plus Lyse Puffer gelöst. Um die nicht gelösten Zellbestandteile zu filtrieren, wurde das gesamte Volumen auf einen QIA Schredder Column gegeben und 2min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde für die weiteren Schritte verwendet und mit 600µl 70% Ethanol versetzt. In zwei Durchgängen wurde das gesamte Volumen auf ein RNA Column gegeben und jeweils 30sek bei 10.000 U/min zentrifugiert. Anschließend folgten, wie oben beschrieben, dieselben Schritte zur Isolierung der mRNA mit anschließender Überschreibung in cDNA. Die Analyse der Genexpression von ASPP2k wurde mittels qRT-PCR durchgeführt und als Referenzgen diente auch hier das Haushaltsgen 18s.

2.10 Proliferationsanalyse und zytologische Ermittlung der Verdopplungszeit

Für die Quantifizierung des Proliferationsverhaltens der ASPP2k überexprimierenden oder supprimierten Zellen und der entsprechenden EV-Kontroll- Zellen über einen längeren Zeitraum, wurden $7.5 \cdot 10^4$ Zellen/ Well in einer 6-Well-Platte in Kulturmedium über insgesamt 96h im Brutschrank inkubiert und zu definierten Zeitpunkten ausgezählt. Für jeden auszuzählenden Zeitpunkt wurde eine 6-Well-Platte vorbereitet. Nach 24h, 48h und 72h wurden die Zellen der entsprechenden 6-Well-Platte trypsiniert, gesammelt und mittels Vitalfärbung mit Trypanblau und einer Zählkammer nach Neubauer die absolute

Zellzahl im Well bestimmt. Nach 24h und 48h wurden hierfür die Zellen in einer 1,5ml Lösung gesammelt und nach 72h und 96h in einer 3ml Lösung.

Die totale Zellpopulation je Well wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{N}{4} * 10^4 * V_s$$

N = gezählte Zellzahl
 V_s = Volumen der verwendeten Zellsuspension (1,5 bzw. 3ml, je nach Zeitpunkt)

Das Zeitintervall, welches für die Verdopplung der Zellzahl in einer Kultur benötigt wird, bezeichnet man als Populationsverdopplungszeit. [112]

Um diese zu berechnen, wurde zunächst die Wachstumskonstante μ nach Formel 1 ermittelt und anschließend die Verdopplungszeit t_d nach Formel 2 ermittelt.

$$\mu = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0}$$

t = beobachteter Zeitpunkt [h]
 t_0 = Zeitpunkt 0 [h]
 t_d = Verdopplungszeit [h]
 x_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt 0
 x_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t
 μ = Wachstumskonstante [h^{-1}]

Formel 1: Berechnung der Wachstumskonstanten μ .

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit t_d .

$$t_d = \frac{\ln(2) * t}{x_t - x_0}$$

Formel 3: Integrierte Formel zur Berechnung der Verdopplungszeit t_d .

2.11 Apoptosebestimmung mittels FACS- Analyse

2.11.1 FACS

Das fluorescence activated cell sorting (FACS) oder die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung und Identifikation von Zellpopulationen. Hierzu werden die physikalischen und molekularen Zelleigenschaften wie Größe und Granularität der Zelle sowie Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche zur Analyse genutzt. Die Zellen werden in einer Einzelzellsuspension vom Gerät so angesaugt, dass sie einzeln und nacheinander den Messbereich eines Laserstrahls passieren. Das dabei entstehende Streulicht wird von Detektoren erfasst und ausgewertet. Das in Richtung Lichtquelle gemessene Vorwärtsstreulicht (FSC= Forward light scatter) ist hierbei ein Maß für das Volumen der Zelle, wohingegen das senkrecht zur Lichtquelle gemessene Seitwärtsstreulicht (SSC= Sideward scatter) Informationen über die innere Zellmorphologie wie Zellgranularität oder Struktur des Zellkerns liefert [113].

Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen kann Fluoreszenzlicht detektiert und gemessen werden. Hierfür verwendet man Farbstoffe, die entweder direkt an Zellbestandteile wie bsp. Propidiumiodid (PI) binden oder die antikörpergebunden bestimmte Zielproteine auf der Zelloberfläche markieren und deren Expression sichtbar machen. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen dabei charakteristische Absorptions- und Emissionsspektren.

Durch die Kombination von zellspezifischen Parametern, wie Größe und Granularität sowie Fluoreszenzmarkierung von Antigenen, kann jede Zelle individuell analysiert und entsprechende Zellpopulationen voneinander separiert werden [113].

In den hier durchgeführten Analysen wurden den untersuchten Zellen zwei Untersuchungsparameter zugeordnet und zur Darstellung der Zellpopulationen ein zweiaxsiges Punktdiagramm gewählt. Jede Achse im Punktdiagramm entspricht dabei einem Untersuchungsparameter und ein Punkt im Diagramm stellt eine gemessene Zelle dar [113].

2.11.2 Apoptosebestimmung mittels FITC/ PI und APC/ 7-AAD

Als Apoptose bezeichnet man den aktiven Stoffwechselprozess, welcher einem zelleigenen Mechanismus folgt und als physiologischer Abschnitt der Zellentwicklung letztlich im programmierten Zelltod mündet. Im Gegensatz zur Nekrose oder dem unbeabsichtigten Zelltod kommt es im Verlauf der Apoptose zu charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle mit Fragmentierung des Zellkerns, Kondensierung des Erbguts und Zytoplasmas sowie Verlust der Zellmembranintegrität [114, 115].

In lebenden Zellen ist Phosphatidylserin (PS) auf der zytoplasmatischen Zellmembranseite lokalisiert. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur charakteristischen Translokation von PS auf die Außenseite der Zellmembran, wodurch die apoptotische Zelle durch Makrophagen erkannt und phagozytiert werden kann [116]. An dieses externalisierte PS kann sich Annexin V, ein Kalzium (Ca^{2+})-abhängiger Phospholipid-Bindungspartner, anlagern und bei Kopplung eines Farbstoffes die apoptotische Zelle in der FACS-Analyse markieren [117, 118]. Bei ASPP2k überexprimierenden Zellen wurde hierfür der grün fluoreszierende Farbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) an Annexin V gekoppelt. Für die Suppression von ASPP2k wurde ein grün fluoreszierendes ASPP2k knock-down Plasmid (tGFP) verwendet, weshalb in diesen Zelllinien die apoptotischen Zellen im FACS mittels rot fluoreszierendem Allophycocyanin (APC) gekoppeltem Annexin V detektiert wurden.

Abgestorbene oder tote Zellen verlieren ihre Zellmembranintegrität, wodurch PI bzw. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) in den Zellkern eindringen kann und an die DNA der Zelle bindet. In der Durchflusszytometrie leuchten diese Zellen bei fluoreszierendem Licht rot.

Nach Färbung der ASPP2k überexprimierenden Zellen mit der Farbstoffkombination FITC Annexin V/ PI (Protokoll gemäß Invitrogen®) zeigen sich apoptotische Zellen grün und abgestorbene Zellen rot fluoreszierend in der FACS-Analyse. Hingegen sind apoptotische und abgestorbene ASPP2k supprimierte Zellen nach Farbstoffkombination APC Annexin V/ 7-AAD (Protokoll gemäß BioLegend®) in durchflusszytometrisch unterschiedlichen

Wellenlängen jeweils rot fluoreszierend und lassen sich hierdurch den entsprechenden Zellpopulationen zuteilen.

2.11.3 Behandlung der Zellen und Messung des Apoptoseverhaltens

Zur Untersuchung des Einflusses von ASPP2k auf die Induktion von Apoptose wurden die Zellen mit dem Standardchemotherapeutikum Oxaliplatin für 48h behandelt und anschließend mittels FACS Durchflusszytometrie analysiert.

Oxaliplatin ist ein Zytostatikum, welches durch Quervernetzungen in und zwischen den DNA-Strängen zu einer Hemmung der DNA-Synthese führt. In Kombination mit bsp. 5-FU/ Folinsäure oder Capecitabine ist es Teil des Therapieschemas bei der Behandlung fortgeschrittener KRK [5].

Nach vorangegangener Ermittlung der Sensitivität der Zellen wurde im experimentellen Ansatz eine Behandlung der Zellen mit Oxaliplatin in den Konzentrationen 10µM, 20µM, 30µM, 40µM und 50µM vorgenommen. Hierfür wurden in einer 12-Well-Platte 150.000 Zellen/ Well vorgelegt und am darauffolgenden Tag, bei einer Zelldichte von 70- 80%, mit Oxaliplatin in der gewünschten Konzentration behandelt. Eine unbehandelte Probe diente als Kontrolle. Nach 48h Inkubationszeit im Brutschrank wurde für die Analyse der gesamte Inhalt eines Wells in ein FACS-Röhrchen überführt. Das Kulturmedium sowie 500µl PBS zum Spülen der Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit 500µl 0,05% Trypsin gelöst und mit weiteren 500µl Kulturmedium gespült und im selben FACS-Röhrchen gesammelt. Die gesamte Zellsuspension wurde bei 1200U/min 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 100µl 1x Annexin V Binding Buffer resuspendiert sowie entweder mit 2µl FITC Annexin V und 5µl PI oder 2µl APC Annexin V und 5µl 7-AAD gefärbt. Zur Zellanalyse wurde nach 30min Inkubation im Dunkeln das Gemisch mit weiteren 300µl 1x Annexin V Binding Buffer verdünnt und die FACS-Messungen innerhalb von 60min durchgeführt.

Von jeder Probe wurden 20.000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert und mit der Analysesoftware CellQuest der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt und

ausgewertet. Anschließend wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve in GraphPad Prism erstellt und der IC₅₀- Wert der induzierten Apoptose durch Oxaliplatin berechnet.

2.12 Migrationsanalyse

Um den Einfluss von ASPP2k auf das Migrationsverhalten der kolorektalen Karzinomzelllinien zu untersuchen, wurde eine Analyse der Zellmigration durchgeführt.

2.12.1 Transwell Migrationsassay

Um das Migrationspotenzial der vier kolorektalen Zelllinien und ihrer entsprechenden EV-Kontrollen untersuchen zu können, wurde ein Transwell Migrationsassay durchgeführt. Hierfür wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in 1,5ml purem McCoy's 5A-Kulturmedium in die obere Kammer des 0,33cm² großen Transwells mit einer Membran mit 8µm Poren gegeben. Um ein Konzentrationsgefälle herzustellen und die Zellen zur Migration durch die Poren anzuregen, wurde in die untere Kammer 2,5ml McCoy's 5A-Kulturmedium mit 20% FBS gegeben. Nach 16h Inkubationszeit im Brutschrank wurde das gesamte Medium aus der oberen und unteren Kammer entfernt. Mittels Wattestäbchen wurden die Zellen auf der Oberseite der Membran, die nicht durch die Poren migriert waren, entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden mit Ethanol fixiert. Hierzu wurde 1,5ml 70% Ethanol in die untere Kammer gegeben und die Membran wieder eingesetzt. Nach 10min wurde das Ethanol entfernt und die Membran 15min getrocknet sowie anschließend die migrierten Zellen mittels Giemsa-Lösung (1:10 in Wasser) gefärbt. Überschüssige Farbreste wurden abgewaschen und die Membran weitere 15min getrocknet. Für eine quantitative Analyse wurden mittels Fotomikroskop in einer 20-fachen Vergrößerung 5 zufällige Felder auf der Membran ausgezählt und die migrierte Zellzahl der ASPP2k modifizierten Zellen mit den entsprechenden EV-Kontrollen verglichen.

2.12.2 Wundheilungsassay

Für die Untersuchung der DLD-1 ASPP2k überexprimierenden sowie herunterregulierten Zelllinien und ihrer entsprechenden EV- Kontrolle wurde in 6 Wells einer 6-Well-Platte je $6 \cdot 10^6$ Zellen/ Well mit komplettem McCoy's 5A-Kulturmedium angesetzt. Am darauffolgenden Tag, als die Zellen eine Zelldichte von 100% erreicht hatten, wurde unter sterilen Bedingungen das Medium entfernt. Zur Beseitigung von toten oder nicht adhärenen Zellen wurde die Zelloberfläche mit PBS gespült. Anschließend wurde mit einer 200 μ l Pipettenspitze eine Wunde in der Zelloberfläche erzeugt. Um die Wundränder klar darzustellen und die gelösten Zellen zu beseitigen, wurden die Zellen erneut mit PBS gespült und in komplettem McCoy's 5A-Kulturmedium mit 10% FBS im Brutschrank kultiviert. Um das Migrationsverhalten der Zellen sichtbar zu machen, wurde direkt nach der Erzeugung der Wunde sowie in einen Zeitraum von 12h alle 2h und abschließend nach 24h ein Foto mit 10-facher Vergrößerung von derselben Stelle der Wunde aufgenommen. Zur Quantifizierung der Zellmigration wurde der Abstand der Wundränder mit Hilfe der NIS Elements Software ausgemessen und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse die Wundheilungsgeschwindigkeit verglichen.

2.13 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte, je nach Indikation, mittels ungepaartem Student's t-Test bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. Die graphische Aufarbeitung sowie statistische Auswertung erfolgte mit der Computersoftware Microsoft Excel® und GraphPad Prism Version 9.0.0 für Windows.

3 Ergebnisse

3.1 Kolorektale Karzinome weisen eine erhöhte ASPP2k Expression im Vergleich zum tumorfreien Gewebe auf

Um die *in vivo* Expression von ASPP2k in Patienten mit KRK nachzuweisen, wurden die mRNA-Level von ASPP2k in 15 kolorektalen Adenokarzinom Gewebeproben (G2/G3) quantifiziert und mit den durchschnittlichen ASPP2k mRNA-Leveln aus gesundem kolorektalen Geweben (n= 14) verglichen.

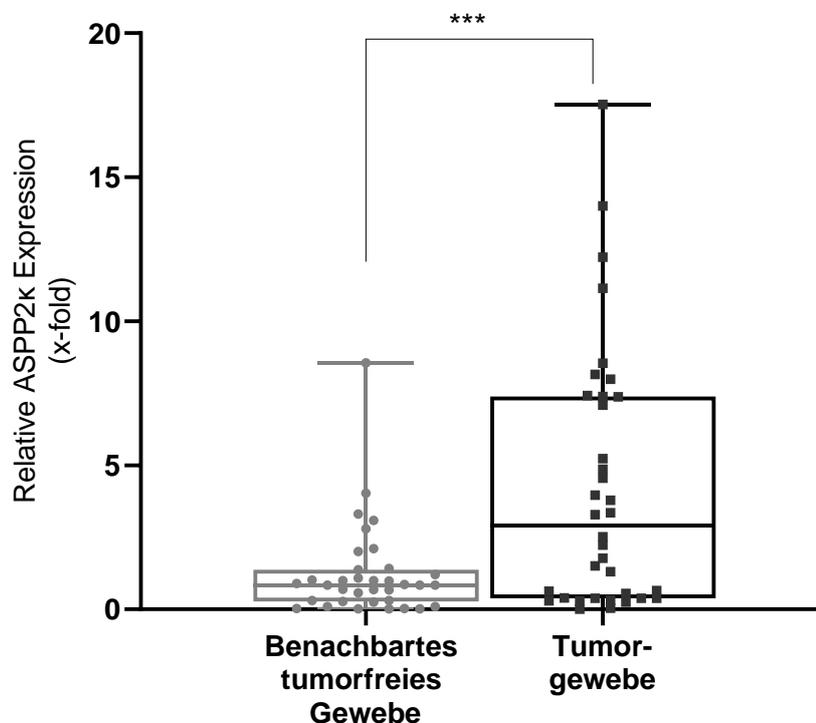


Abbildung 7: ASPP2k spezifische qRT-PCR zeigt signifikant erhöhte ASPP2k mRNA-Expressionslevel in kolorektalem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Kolongewebe. Abgebildet sind die durchschnittlichen relativen ASPP2k-Expressionslevel der tumorfreien Gewebeproben neben denen der Karzinomgewebeproben als Box-Whisker-Plot, wobei die horizontale Linie jeweils den Mittelwert dargestellt. Statistischer Test: ungepaarter Student's t-Test, *** $p \leq 0,001$. Abbildung modifiziert aus [1].

Die Analyse der qRT-PCR Daten zeigte, dass ASPP2k in kolorektalen Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten tumorfreien Gewebe signifikant erhöht exprimiert ist. Betrachtet man den Durchschnittswert des relativen

ASPP2k-Expressionslevels, so ist dieser im Tumorgewebe um das 3-fache höher als im benachbarten tumorfreien Darmgewebe ($p \leq 0,001$) [1]. Auffällig war außerdem, dass die relativen Expressionsniveaus sehr stark variierten und von Nicht-Expressoren bis hin zu einer 17-fach höheren ASPP2k-Expression in einigen Tumorgeweben reichten.

Um die große Variation genauer zu betrachten, wurde anschließend die ASPP2k-Expression von Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden tumorfreien Gewebe im selben Patienten analysiert. Zu diesem Zweck wurden die ASPP2k mRNA-Level der kolorektalen Tumorgewebe mit den ASPP2k mRNA-Level der benachbarten gesunden kolorektalen Gewebe verglichen. In Abbildung 8 und Tabelle 3 sind die individuellen ASPP2k-Expressionslevel der Patienten dargestellt.

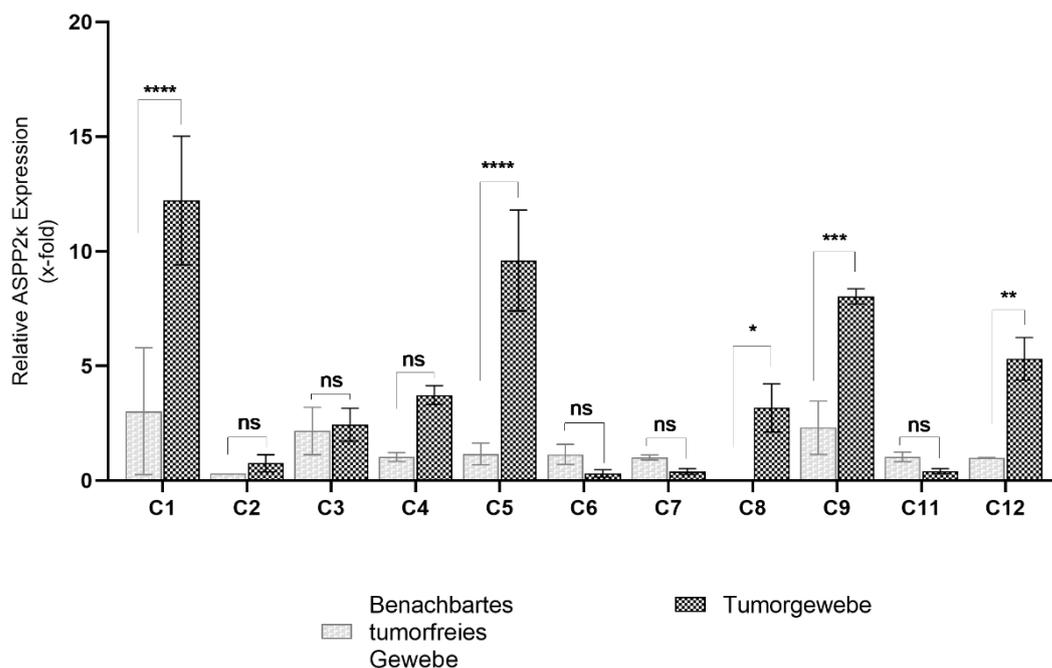


Abbildung 8: ASPP2k spezifische qRT-PCR zeigt in 45% der Fälle eine signifikant erhöhte ASPP2k-Expression der kolorektalen Tumorgewebeproben im Vergleich zum benachbarten tumorfreien Gewebe. Von 12 Patienten wurde jeweils das ASPP2k-Expressionslevel des kolorektalen Tumorgewebes mit dem benachbarten tumorfreien Kolongewebe verglichen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der dreifach durchgeführten Messungen sowie der entsprechende Standardfehler. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, ns= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Abbildung modifiziert aus [1].

Beim individuellen Vergleich der ASPP2κ-Expression in Patienten mit KRK zeigte sich bei 5 von 11 Patienten (45%) ein signifikant erhöhtes ASPP2κ-Expressionslevel im Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten tumorfreien Kolongewebe mit großer Variabilität der Differenz der jeweiligen Expressionslevel [1]. Patient C10 wurde aus der Analyse ausgeschlossen, da hier ein R1 Resektionsstatus vorlag.

Tabelle 3: Relative ASPP2κ-Expression der kolorektalen Tumorproben im Vergleich zur ASPP2κ-Expression des gesunden kolorektalen Gewebes desselben Patienten.

<i>Patient</i>	<i>ASPP2κ- Expressionslevel tumorfreies Gewebe</i>	<i>ASPP2κ- Expressionslevel Tumorgewebe</i>	<i>Differenz</i>	<i>Signifikanz</i>
C1	3,0	12,2	9,2	****
C2	0,3	0,8	0,5	ns
C3	2,2	2,4	0,2	ns
C4	1,0	3,7	2,7	ns
C5	1,2	9,6	8,4	****
C6	1,2	0,3	-0,9	ns
C7	1,0	0,4	-0,6	ns
C8	0,0	3,2	3,2	*
C9	2,3	8,0	5,7	***
C11	1,0	0,4	-0,6	ns
C12	1,0	5,3	4,3	**

3.2 ASPP2 κ -Expression ist stressinduzierbar im KRK

Um zu zeigen, dass ASPP2 κ stressinduzierbar ist, wurden für die Zelllinien DLD-1 p53 ^{+/+} und HCT-116 p53 WT die Konditionen der Zellkultur geändert und anschließend mittels qRT-PCR die ASPP2 κ -Expressionslevel bestimmt.

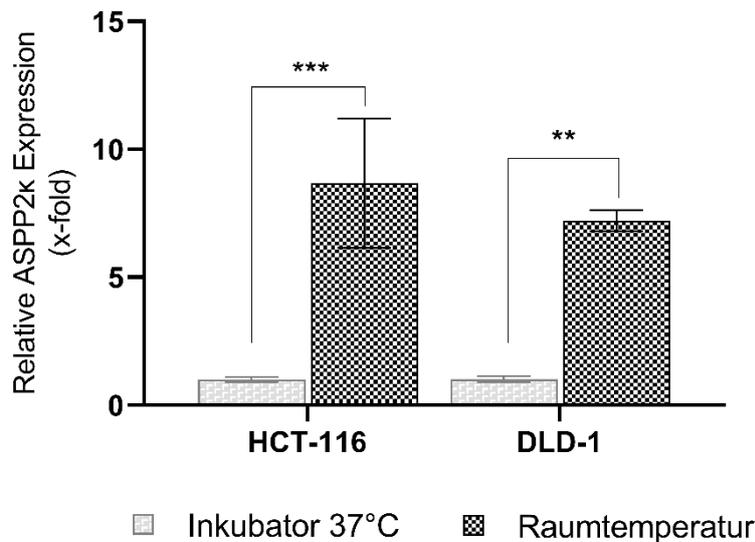


Abbildung 9: ASPP2 κ spezifische qRT-PCR von zwei kolorektalen Zelllinien zeigt eine signifikant erhöhte ASPP2 κ -Expression nach 24h Inkubation bei RT. Verglichen wurde das ASPP2 κ -Expressionslevel von DLD-1 p53 ^{+/+} sowie HCT-116 p53 WT, die entweder 24h im Brutschrank oder 24h bei RT inkubiert wurden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der dreifach durchgeführten Messungen mit entsprechendem Standardfehler. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, ***p \leq 0,001, *p \leq 0,01. Abbildung modifiziert aus [1].

Nach 24h Inkubation in Raumtemperatur (RT), zeigte sich in beiden Zelllinien eine deutliche Stressinduzierbarkeit von ASPP2 κ (Abbildung 9). So wurde ein signifikant erhöhtes ASPP2 κ -Expressionslevel nach 24h Inkubation bei RT in beiden untersuchten Zelllinien im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle nachgewiesen [1].

HCT-116 wiesen nach 24h Inkubation bei RT ein 7,7-fach höheres ASPP2 κ -Level auf als ihre Kontrolle, welche unter optimalen Bedingungen inkubiert wurde.

In der zweiten kolorektalen Zelllinie DLD-1 zeigte sich nach 24h Inkubation bei RT ein 6,2-fach höheres ASPP2 κ -Expressionslevel.

3.3 Etablierung und Validierung der isoformspezifischen ASPP2 κ überexprimierenden und attenuierten Zellmodelle

Nachdem ein erhöhtes ASPP2 κ -Level in kolorektalen Karzinompatientenproben nachgewiesen und eine Stressinduzierbarkeit der ASPP2 κ -Expression beobachtet werden konnte, wurde anschließend die Funktion und Rolle von ASPP2 κ im KRK untersucht. Als Ausgangszellmodelle dienten wiederum die kolorektalen Karzinomzelllinien DLD-1 und HCT-116, die durch einen p53 Wildtyp gekennzeichnet sind.

Für die Erstellung von ASPP2 κ überexprimierenden Zellmodellen wurden die entsprechenden Zelllinien mit einem ASPP2 κ Plasmid-DNA-Vektor bzw. einem Empty-Vector-Kontrollplasmid transfiziert. Nach anschließender Phleomycin D1 (Zeocin®)- Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen, erfolgte der Nachweis der ASPP2 κ -Überexpression durch die Quantifizierung der relativen ASPP2 κ mRNA-Expression mittels spezifischer qRT-PCR. In Abbildung 10 werden die relativen ASPP2 κ mRNA-Expressionslevel der ASPP2 κ überexprimierten DLD-1 und HCT-116 im Vergleich zur Empty-Vector-Kontrolle veranschaulicht.

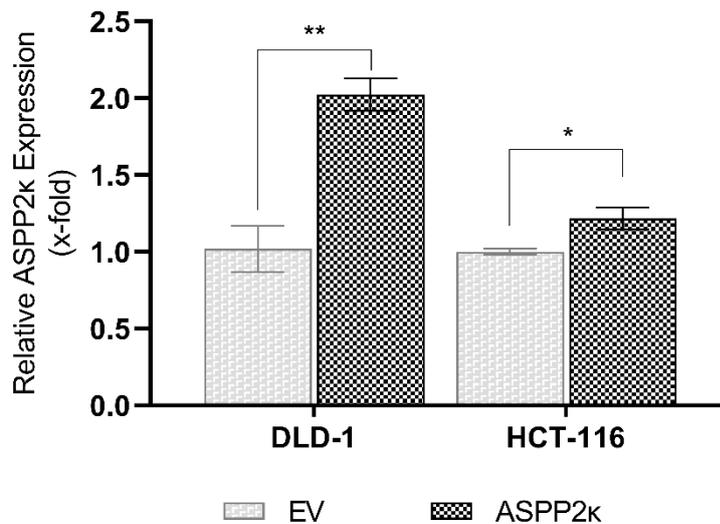


Abbildung 10: Nach erfolgreicher Transfektion zeigen ASPP2κ.DLD-1 und ASPP2κ.HCT-116 im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression von ASPP2κ. Die relative ASPP2κ-mRNA-Expression der ASPP2κ.DLD-1 und ASPP2κ.HCT wurde in Bezug zu ihrer entsprechenden Empty-Vektor-Zelllinie ermittelt. Als Referenzgen diente 18s. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der dreifach durchgeführten qRT-PCR Messung sowie der entsprechende Standardfehler. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, *p≤ 0,05, **p≤ 0,01. Abbildung modifiziert aus [1].

Das mittlere ASPP2κ-Expressionsniveau der ASPP2κ überexprimierenden DLD-1 war im Vergleich zu EV.DLD-1 Zellen mit einer relativen Expression von 2,02 mehr als verdoppelt (p≤ 0,01). In HCT-116 konnte eine relative ASPP2κ-Überexpression im Vergleich zur EV-Kontrolle von 1,20 und entsprechend 20% erzielt werden (p≤ 0,05) [1].

Um die funktionelle Rolle von ASPP2κ im KRK zu untersuchen, wurden zudem zwei Zellmodelle mit supprimierter ASPP2κ-Expression etabliert.

Die Transduktion erfolgte, wie im Kapitel 2.7 beschrieben und mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde vor Selektion mittels Puromycin die Transduktionseffizienz überprüft (Abbildung 11).

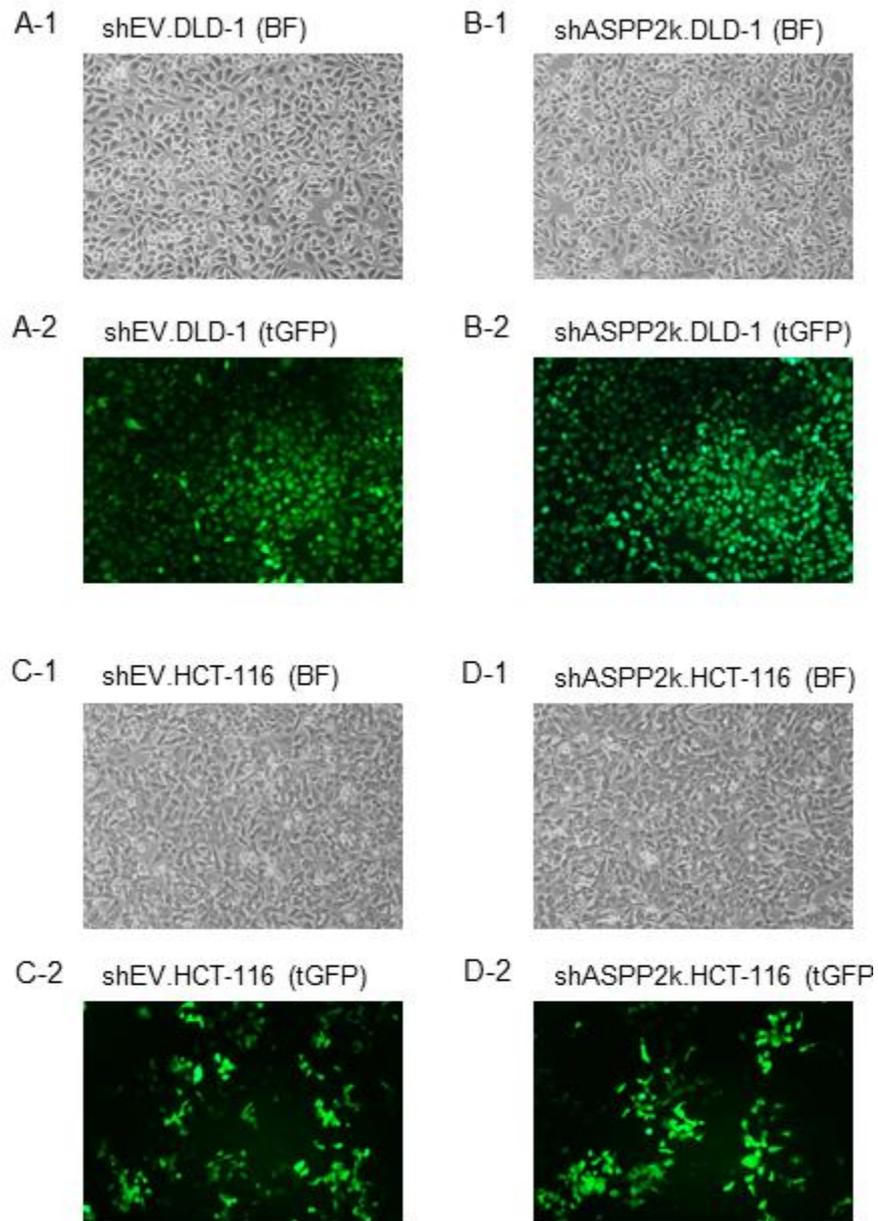


Abbildung 11: Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der erfolgreich transduzierten Zellen. A-1, B-1, C-1 und D-1 zeigen Hellfeldmikroskopieaufnahmen (BF) (10-fache Vergrößerung) der transduzierten Zellen. A-2, B-2, C-2 und D-2 zeigen die transduzierten, GFP-positiven Zellen im jeweils dazugehörigen Fluoreszenzmikroskopiebild des gleichen Bildausschnitts.

Um auf mRNA-Ebene die tatsächliche ASPP2k-Suppression in beiden Zellmodellen nachzuweisen, wurde die relative ASPP2k-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Abbildung 12 stellt die relative ASPP2k mRNA-Expression der ASPP2k supprimierten Zellen im Vergleich zu ihrer EV-Kontrolle dar.

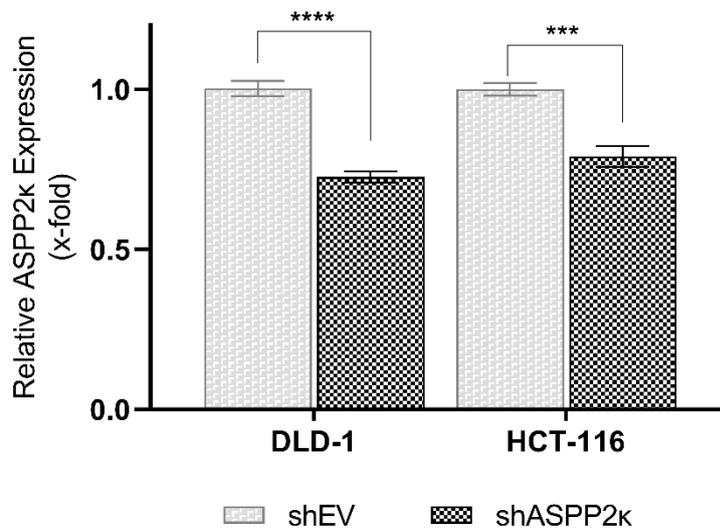


Abbildung 12: Nach erfolgreicher Transduktion zeigen shASPP2k.DLD-1 und shASPP2k.HCT-116 eine signifikant verminderte ASPP2k-Expression im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle. Verglichen wurde das ASPP2k-Expressionslevel der shEV.DLD-1 und shEV.HCT-116-Zellen und der ASPP2k attenuierten DLD-1 und HCT-116 Zellen mittels qRT-PCR für ASPP2k. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der dreifach durchgeführten qRT-PCR mit dem entsprechenden Standardfehler. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Abbildung modifiziert aus [1].

In beiden Zellmodellen zeigte sich eine signifikant verminderte ASPP2k mRNA-Expression in den ASPP2k-supprimierten Zelllinien.

So war im DLD-1 Zellmodell das mittlere ASPP2k-Expressionsniveau der ASPP2k supprimierten DLD-1 im Vergleich zur Leervektorkontrolle 0,73 und damit um 27% reduziert ($p \leq 0,0001$), sowie das mittlere ASPP2k-Expressionsniveau der ASPP2k supprimierten HCT-116 Zellen 0,79 im Vergleich shEV.HCT-116 und entsprechend die relative Expression um 21% vermindert ($p \leq 0,001$) [1].

3.4 ASPP2 κ moduliert die Sensitivität gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose im kolorektalen Tumorzellmodell

Die Auswirkung der ASPP2 κ -Expression in kolorektalen Tumorzellen auf die Therapiesensitivität gegenüber Standardchemotherapeutika sollte anhand der etablierten ASPP2 κ überexprimierten und ASPP2 κ attenuierten Zellmodelle untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen für 48h in ansteigenden Konzentrationen mit dem in der Therapie des KRK standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutikum Oxaliplatin behandelt und anschließend die Induktion der Apoptose, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, nach standardisiertem Protokoll gemessen.

3.4.1 Überexpression von ASPP2k führt zu gesteigerter Resistenz gegenüber Oxaliplatin

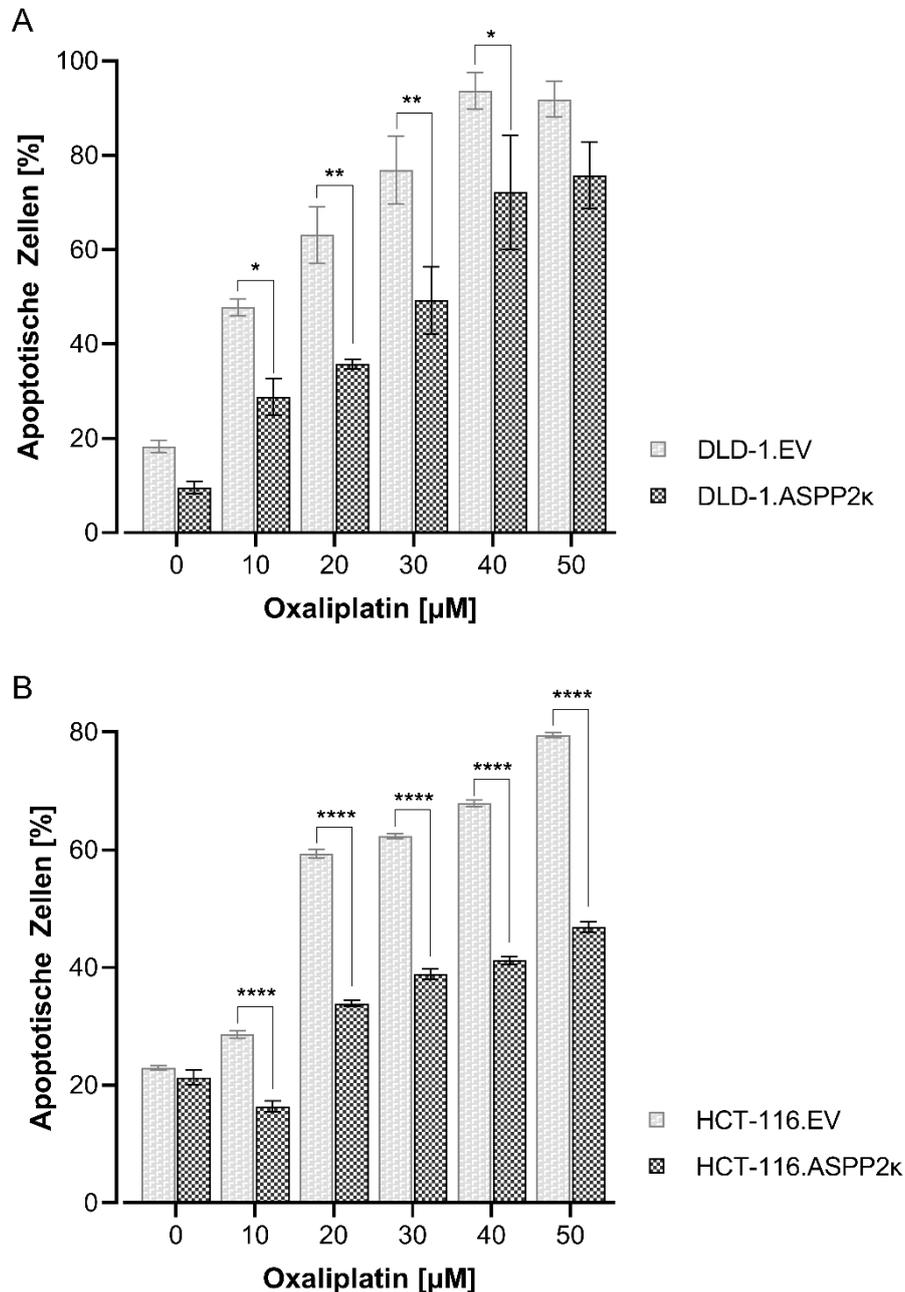


Abbildung 13: Reduzierte Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Oxaliplatin bei heraufregulierter ASPP2k-Expression. ASPP2k überexprimierende DLD-1 (A) und HCT-116 (B) wurden über 48h mit steigender Konzentration Oxaliplatin behandelt und anschließend durchflusszytometrisch die Apoptoserate mittels Annexin V/ PI Testverfahrens ermittelt. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler der dreifach durchgeführten Experimente. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$. Abbildung modifiziert aus [1].

In Abbildung 13 sind die durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteile der apoptotischen ASPP2k überexprimierenden DLD-1 und HCT-116 Zellen jeweils im Vergleich zu ihrer EV-Kontrolle und in Abhängigkeit der eingesetzten Oxaliplatin-Konzentration dargestellt. Es zeigt sich, dass in beiden untersuchten Zellmodellen eine erhöhte ASPP2k-Expression mit einer verminderten Oxaliplatin abhängigen Induktion der Apoptose einhergeht [1]. Zwischen ASPP2k.DLD-1 und EV.DLD-1 konnten signifikante Unterschiede in der Apoptoseinduktion nach 48h Oxaliplatin-Behandlung mit 10µm, 20µm, 30µm und 40µm nachgewiesen werden. Die Behandlung mit 50µm zeigte ebenso den Trend zu einer reduzierten Apoptoseinduktion, was allerdings statistisch nicht signifikant war. ASPP2k.HCT-116 zeigten in jeder untersuchten Dosierung von Oxaliplatin eine signifikant reduzierte Apoptoseinduktion im Vergleich zu ihrer EV-Kontrolle [1].

Als weiteren Parameter zur Veranschaulichung des Apoptoseverhaltens wurde der IC₅₀-Wert für beide Zellmodelle berechnet und in Tabelle 4 dargestellt.

Hierbei zeigte sich, dass zur halbmaximalen Induktion der Apoptose in ASPP2k überexprimierten Zellen im Vergleich zu ihrer EV-Kontrolle eine deutlich höhere Behandlungskonzentration von Oxaliplatin notwendig ist. In ASPP2k.DLD-1 wurde hierfür eine 1,9- und in ASPP2k.HCT-116 eine 2,7-fach höhere Oxaliplatinkonzentration im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle berechnet.

Tabelle 4: Ermittelte IC₅₀- Konzentrationen nach Oxaliplatinbehandlung in ASPP2k.DLD-1 und EV.DLD-1 sowie ASPP2k.HCT-116 und EV.HCT-116.

Zelllinie	IC₅₀ Oxaliplatin [µM]	
	DLD-1	HCT-116
EV-Kontrolle	15,5	28,1
ASPP2k-Überexpression	29,6	75,3

3.4.2 Suppression der ASPP2k-Expression führt zu gesteigerter Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Oxaliplatin

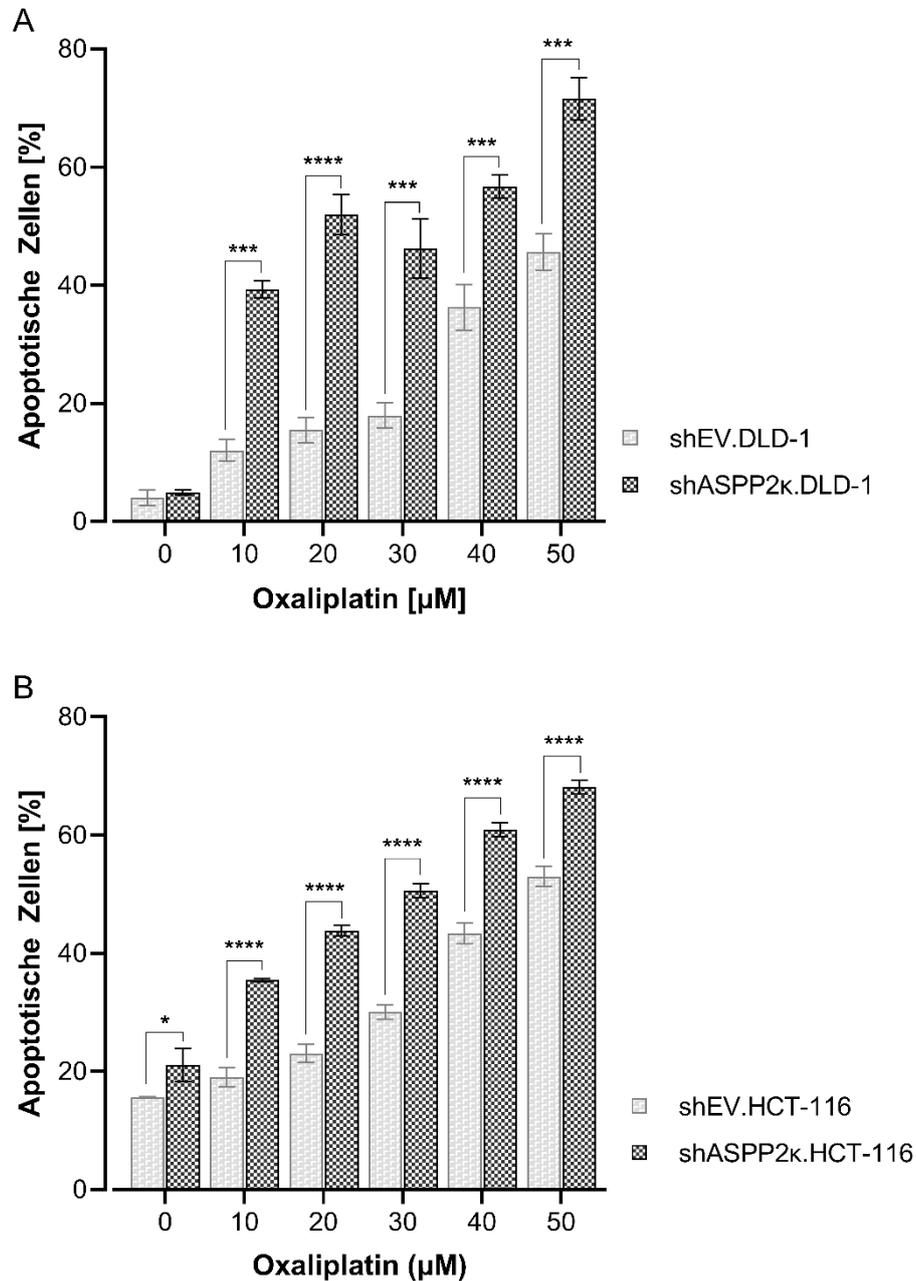


Abbildung 14: Suppression der ASPP2k-Expression führt zu höheren Apoptoseraten nach Behandlung mit Oxaliplatin. Nach 48h Behandlung wurde mittels Annexin V/ 7-AAD-Assay der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen gemessen und mit auf der x-Achse ansteigender Oxaliplatinkonzentration dargestellt. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert der dreifach durchgeführten Experimente mit zugehörigem Standardfehler. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$. Abbildung modifiziert aus [1].

Abbildung 14 zeigt, dass nach Behandlung und Ermittlung des Anteils an apoptotischen Zellen in allen untersuchten Behandlungsdosierungen von Oxaliplatin ASPP2k supprimierte DLD-1 und HCT-116 eine erhöhte Apoptoseinduktion im Vergleich zur jeweiligen EV-Zelllinie aufweisen [1].

Analog wurde auch hier der IC_{50} -Wert für beide Zellmodelle berechnet und in Tabelle 5 dargestellt. So führte ASPP2k-Suppression in DLD-1 zu einer 45% niedrigeren IC_{50} und in HCT-116 zu einer 72% niedrigeren IC_{50} für Oxaliplatin.

Tabelle 5: Ermittelte IC_{50} - Konzentrationen für Oxaliplatinbehandlung in shASPP2k.DLD-1 und shEV.DLD-1 sowie shASPP2k.HCT-116 und shEV.HCT-116.

Zelllinie	IC_{50} Oxaliplatin [μM]	
	DLD-1	HCT-116
shEV-Kontrolle	58,0	55,0
ASPP2k-Suppression	26,0	40,1

3.5 ASPP2k beeinflusst die Zellproliferation in kolorektalen Tumorzellen

Um das Wachstumsverhalten der kolorektalen Karzinomzellen in Abhängigkeit der ASPP2k-Expression zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten von ASPP2k überexprimierenden als auch ASPP2k supprimierten Zellmodellen untersucht. Hierzu dienten ebenfalls die ASPP2k modifizierten und etablierten DLD-1 und HCT-116 Zellmodelle.

3.5.1 Überexpression von ASPP2k resultiert in gesteigerter Proliferation

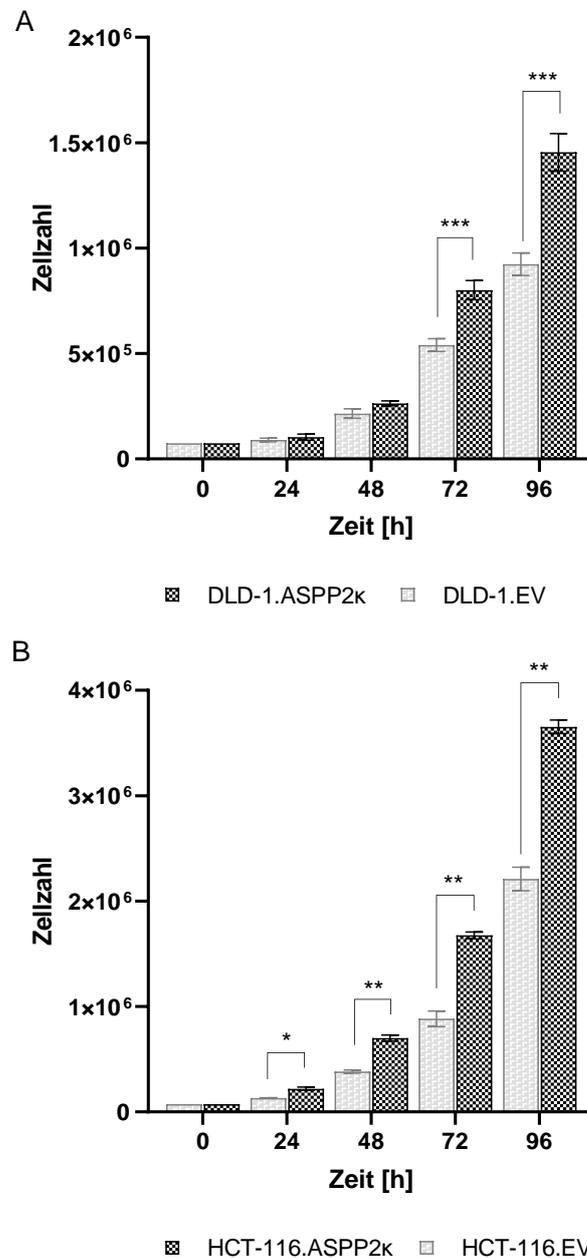


Abbildung 15: ASPP2k überexprimierende Zellen zeigen im Proliferationsassay eine signifikant erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu ihren EV-Kontrollen. DLD-1 und HCT-116 ASPP2k Zellen und ihre EV-Kontrollzellen wurden nach Ansetzen von $7,5 \cdot 10^4$ Zellen in 24h-Inkubationsintervallen für 96h mittels Zählkammer und nach Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch ausgezählt und ausgewertet. Abgebildet sind die Mittelwerte der dreifach durchgeführten Experimente mit zugehörigem Standardfehler in Abhängigkeit des Messzeitpunktes. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abbildung modifiziert aus [1].

Wie in Abbildung 15 dargestellt führte überexprimierte ASPP2 κ -Expression sowohl in DLD-1 als auch in HCT-116 zu einer signifikant gesteigerten Proliferationskapazität im Vergleich zu den EV-Kontrollen [1].

ASPP2 κ .DLD-1 wiesen nach 72h und 96h eine signifikant erhöhte Populationsgröße im Vergleich zu EV.DLD-1 auf [1]. HCT-116 ASPP2 κ zeigten im Vergleich zu ihrer EV-Kontrolle einen signifikanten Unterschied in der Populationsgröße bereits nach 24h [1].

3.5.2 Suppression der ASPP2 κ -Expression resultiert in signifikant attenuierter Proliferation

Wie zu erwarten, zeigte sich analog zur Überexpression von ASPP2 κ , bei der ASPP2 κ -Suppression eine Abnahme der Proliferationskapazität (Abbildung 16). In beiden ASPP2 κ supprimierten Zelllinien DLD-1 und HCT-116 zeigten shASPP2 κ Zellen nach lichtmikroskopischer Auszählung und Analyse im Vergleich zu EV-Kontrollzellen eine abgeschwächte Proliferationskapazität. Die gemessenen signifikanten Unterschiede zwischen shASPP2 κ Zellen und EV-Kontrollzellen ergaben sich in beiden Zellmodellen nach 72h und 96h [1].

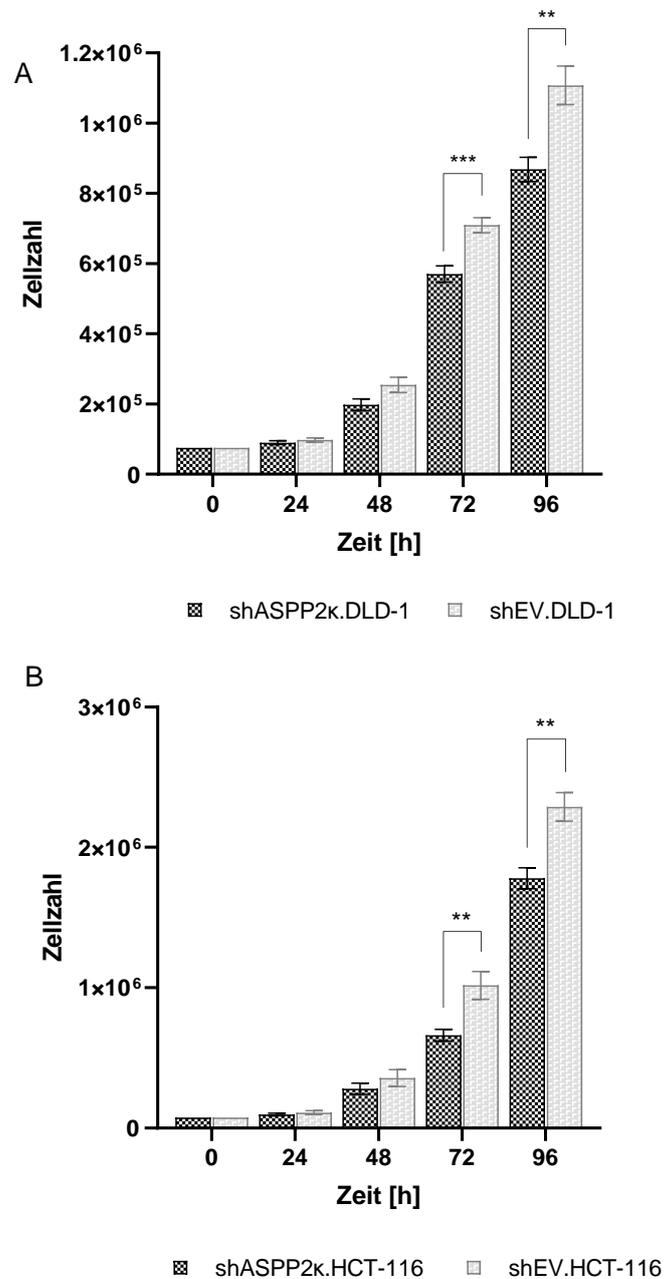


Abbildung 16: Suppression der ASPP2 κ -Expression resultiert in einer abgeschwächten Proliferationskapazität. Mittels Zählkammer wurde lichtmikroskopisch, über einen Zeitraum von 4 Tagen in 24h-Intervallen, die Zellzahl der proliferierten shASPP2k DLD-1 und HCT-116 sowie ihrer EV-Kontrollen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der dreifach durchgeführten Messung mit Standardfehler in Abhängigkeit des Beobachtungszeitpunkts. Statistischer Test: zweifaktorielle Varianzanalyse, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abbildung modifiziert aus [1].

3.5.3 ASPP2 κ -Expression beeinflusst die Verdopplungszeit

Zur weiteren Quantifizierung des Einflusses von ASPP2 κ auf das Proliferationsverhalten wurde für die ASPP2 κ heraufregulierten sowie ASPP2 κ knock-down Zellmodelle die Verdopplungszeit t_d berechnet (siehe Kapitel 3.7). Innerhalb der Verdopplungszeit dupliziert sich eine Population und ist somit repräsentatives Maß für die Proliferationskapazität eines Zellmodells. In Tabelle 6 sind die Verdopplungszeiten t_d der ASPP2 κ modifizierten DLD-1 und HCT-116 Zellmodelle aufgeführt.

Tabelle 6: Verdopplungszeit t_d der ASPP2 κ modifizierten Zelllinien im Vergleich zu den EV-Kontrollen.

Zelllinie	Verdopplungszeit t_d [h]	
	DLD-1	HCT-116
EV-Kontrolle	26,4	19,7
ASPP2 κ -Überexpression	22,3	17,0
shEV-Kontrolle	24,4	19,5
ASPP2 κ -Suppression	26,9	21,2

Die Überexpression von ASPP2 κ führte in DLD-1 zu einer um 16% und in HCT-116 zu einer um 14% schnelleren Zellverdopplungszeit im Vergleich zur jeweiligen EV-Kontrolle [1]. Im Gegensatz dazu zeigten ASPP2 κ supprimierte DLD-1 eine 10% und HCT-116 9% verlängerte Verdopplungszeit verglichen mit ihren EV-Kontrollen [1].

3.6 ASPP2 κ beeinflusst das Migrationsverhalten von kolorektalen Tumorzellen

Die Auswirkungen von ASPP2 κ auf die Zellmigration wurde mittels der etablierten ASPP2 κ überexprimierenden und ASPP2 κ supprimierten Zellmodellen in Migrationsassays untersucht.

Für die Untersuchung des Migrationspotenzials standen, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, der Transwell Migrationsassay sowie Wundheilungsassay zur Verfügung.

3.6.1 Überexpression von ASPP2 κ resultiert in gesteigerter Migration

In Abbildung 17 sind die migrierten Zellen der ASPP2 κ Zelllinien im Vergleich zur EV-Kontrolle im Transwell Migrationsassay aufgezeigt. In beiden untersuchten Zellmodellen ließ sich ein signifikant gesteigertes Migrationsverhalten der ASPP2 κ Zellen nachweisen. So zeigten DLD-1 ASPP2 κ eine 36% ($p \leq 0,01$) und HCT-116 ASPP2 κ eine um 58% ($p \leq 0,0001$) gesteigerte Migrationsrate im Vergleich zu den respektiven EV-Kontrollen [1].

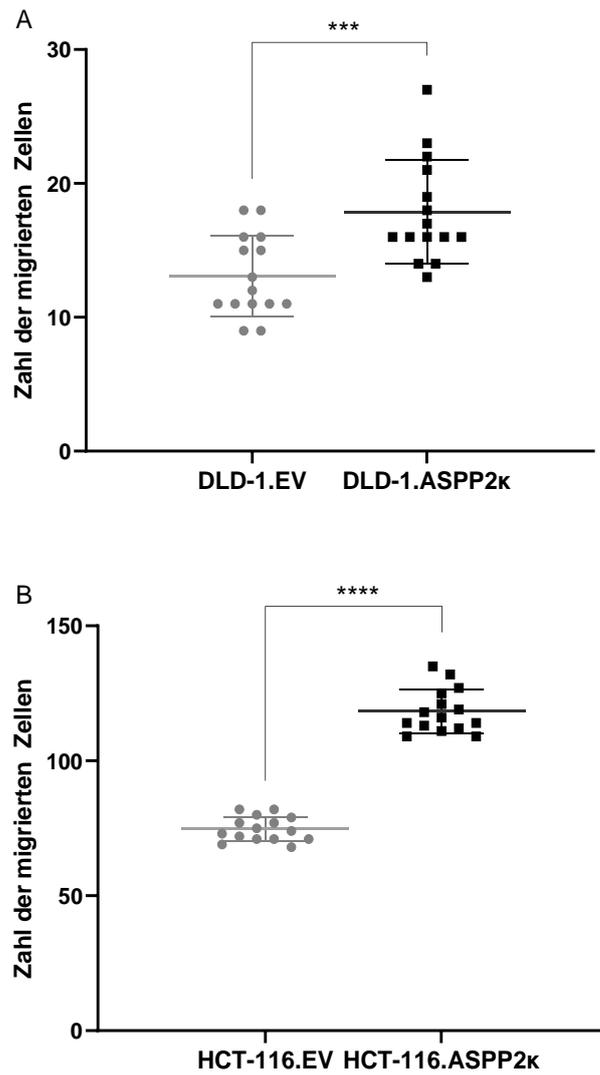


Abbildung 17: Überexpression von ASPP2k führt in kolorektalen Karzinomzellen zu einem signifikant erhöhten Migrationspotenzial. Der Mittelwert an absolut migrierten DLD-1 ASPP2k (A) und HCT ASPP2k Zellen (B) sowie ihren entsprechenden EV-Kontrollzellen sind als waagrechte Linien im Streudiagramm dargestellt. Statistischer Test: ungepaarter Student's t-Test, *** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$. Abbildung modifiziert aus [1].

3.6.3 Überexpression von ASPP2k bestätigt im Wundheilungsassay das erhöhte Migrationspotenzial

Um den Einfluss von ASPP2k auf die Zellmigration in kolorektalen Tumorzellen eingehender zu untersuchen, wurde die Migration in DLD-1 mittels Wundheilungsassay ausführlich untersucht. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der DLD-1 ASPP2k Zellen im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

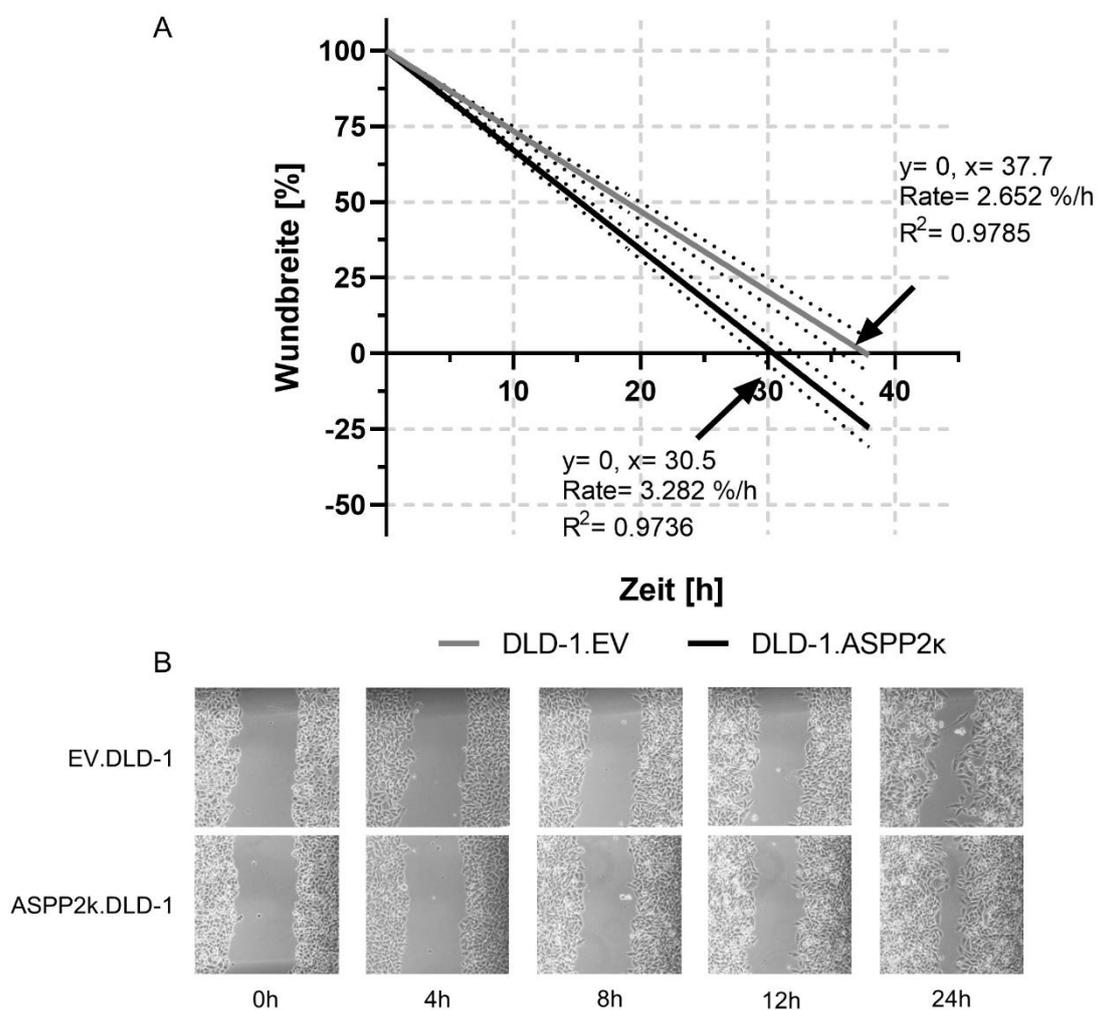


Abbildung 19: ASPP2k überexprimierende Zellen zeigen im Wundheilungsassay ein gesteigertes Migrationsverhalten. Nach Erzeugung der Wunde in der Zelloberfläche wurde über einen Zeitraum von 24h zu definierten Zeitpunkten der Abstand der Wundränder bestimmt und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse die Wundheilungsrate ermittelt (A). Beispielhafte Aufnahmeserie des Wundheilungsexperiments der DLD-1 ASPP2k und ihrer EV-Kontrolle (B). Abbildung modifiziert aus [1].

Wie erwartet zeigen DLD-1 ASPP2k überexprimierende Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle höhere Wundheilungsraten im Wundheilungsassay. So verschloss sich die Wunde der DLD-1 ASPP2k überexprimierten Zellen im Durchschnitt um 3,3%/h wohingegen sich die Wunde der DLD-1 EV-Kontrollzellen nur um 2,7%/h verkleinerte [1].

3.6.4 Suppression von ASPP2k resultiert in verzögertem Wundverschluss

Abbildung 20 zeigt die Wundheilungsfähigkeit der ASPP2k supprimierten DLD-1 Zellen im Vergleich zu ihren EV-Kontrollzellen. Eine verminderte ASPP2k-Expression führt auch in diesem Versuchsansatz zu einer reduzierten Zellmobilitätsrate. So wurde für shASPP2k DLD-1 eine Wundheilungsrate von 2,7%/h und für die EV-Kontrolle von 3,2%/h kalkuliert [1].

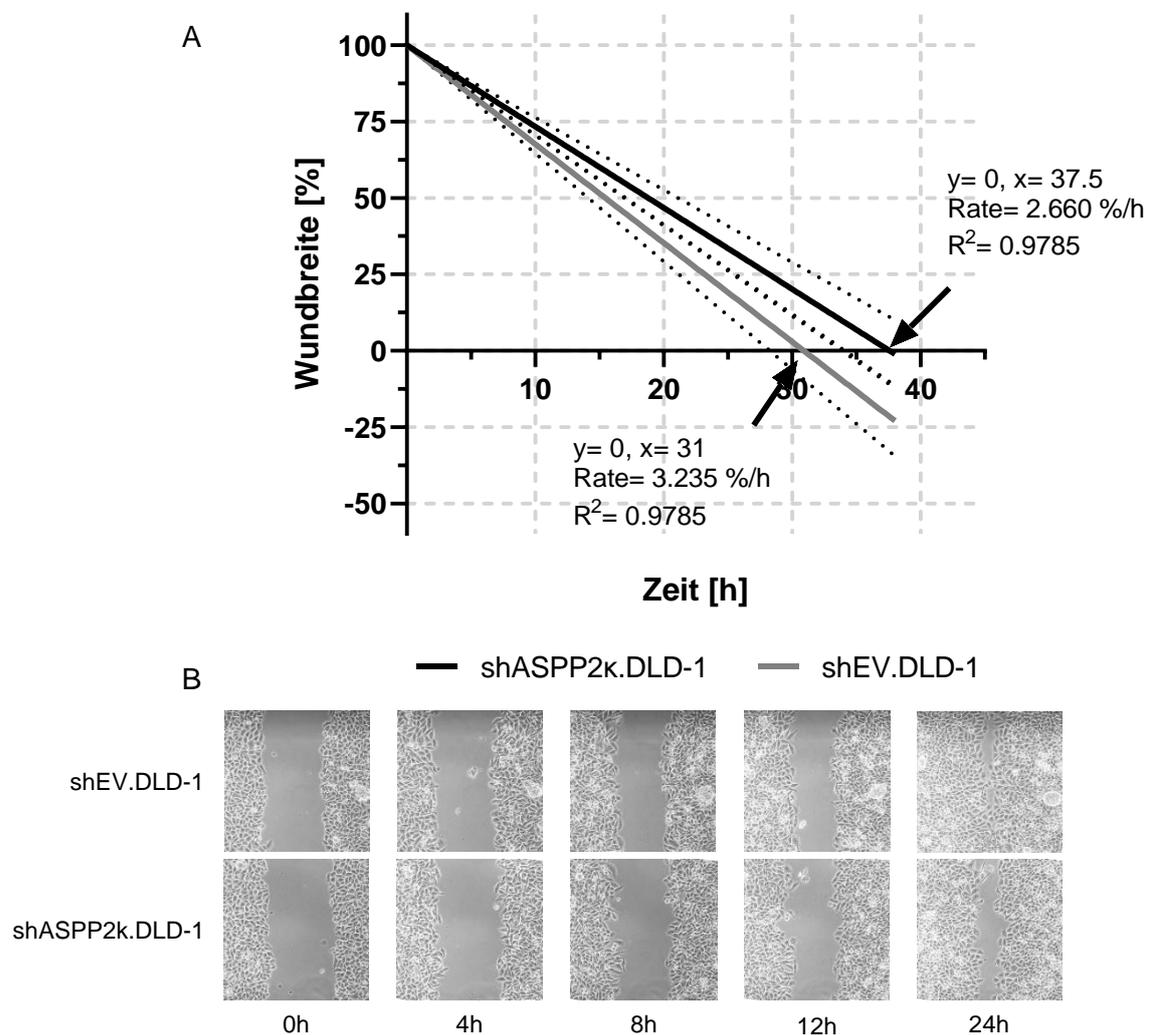


Abbildung 20: ASPP2k-Suppression führt in kolorektalen Karzinomzellen zu einer reduzierten Migrationskapazität im Wundheilungsassay. Nach Wundetablierung in der Zelloberfläche, Ausmessung der Wundränder zu definierten Zeitpunkten und linearer Regressionsanalyse zeigen shASPP2k DLD-1 im Vergleich zur EV-Kontrolle eine verminderte Wundheilungsrate (A). (B) zeigt eine beispielhafte Fotodokumentationsreihe aus dem Beobachtungszeitraum. Abbildung modifiziert aus [1].

4 Diskussion

Trotz enormer Bemühungen im Bereich der Krebsvorsorge und Therapie bleibt das KRK in Deutschland und weltweit weiterhin eine der tödlichsten Krebserkrankungen. Durch die demographische Entwicklung hin zu einer alternden Bevölkerung und das Inkaufnehmen allgemeiner Risikofaktoren wie ungesunder Ernährungsgewohnheiten, Übergewicht oder Rauchen, kommt es zu einer stetig zunehmenden Inzidenz des KRK. Zwar konnten erhebliche Fortschritte im Bereich des pathophysiologischen Verständnisses sowie der Therapie des KRK erzielt werden, jedoch gehen Schätzungen davon aus, dass bis in das Jahr 2030 die Inzidenz der KRK um 60% ansteigt. Dies würde zu einem weltweiten Patientenaufkommen von mehr als 2,2 Millionen KRK-Fällen und 1,1 Millionen Todesfällen führen [119]. Während Frühstadien durch chirurgische Interventionen meist kurativ behandelt werden können, sind fortgeschrittenere Stadien mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden und spätestens die Metastasierung des KRK ist ein limitierender Faktor für die erfolgreiche Behandlung.

In den fortgeschrittenen Tumorstadien ist neben der radikalen Resektion des Tumorgewebes eine adjuvante oder neoadjuvante Polychemotherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einer Radiotherapie, ein fester Bestandteil des Therapieschemas. In den letzten Jahren wurde dieses Behandlungsschema durch verschiedene Antikörper gegen molekulare Zielstrukturen wie BRAF, EGFR oder PD-1 erweitert. Vor der Therapieeinleitung sollte jedoch eine molekulargenetische Charakterisierung des Tumors erfolgen. So hat der Mutationszustand des *RAS*-Gens entscheidenden Einfluss auf die Therapieauswahl, da bei positivem Nachweis eine zielgerichtete Therapie ineffektiv ist [120].

Die ASPP-Familie ist als zentraler Mediator der p53-abhängigen Apoptoseinduktion in einer Vielzahl von Tumorentitäten fehlreguliert und führt in der Folge zu aggressiveren Tumoren und Therapieresistenzen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es die neu entdeckte onkogene Spleißvariante ASPP2k im KRK nachzuweisen und den Stellenwert im KRK hinsichtlich des Einflusses

auf die Apoptoseinduktion, das Proliferationsverhalten sowie das Migrationspotenzial zu untersuchen.

Hierbei erfolgte der Nachweis im KRK mittels Screenings von ASPP2 κ -mRNA in kolorektalen Karzinomgewebeproben. Für die anschließende Charakterisierung der Rolle von ASPP2 κ wurden vier isogene kolorektale Karzinomzellmodelle etabliert, zwei mit ASPP2 κ -Überexpression sowie zwei mit supprimierter Expression von ASPP2 κ .

Anschließend wurde die Sensitivität gegenüber Chemotherapie, das Proliferationsverhalten sowie das Migrationspotenzial der Zelllinien im Vergleich zu ihrer jeweiligen EV-Kontrolle untersucht.

Für den *in vivo* Nachweis von ASPP2 κ im KRK wurde die ASPP2 κ -mRNA-Expression von 15 kolorektalen Karzinomgewebeproben analysiert und mit der ASPP2 κ -Expression von gesundem Kolongewebe verglichen. Hierbei ließ sich eine durchschnittlich 3-fach höhere ASPP2 κ -Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu benachbartem tumorfreiem Kolongewebe feststellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Arbeiten von Schittenhelm et al. sowie Tsintari et al., in welchen erstmalig über eine ASPP2 κ -Überexpression in Leukämien sowie Rhabdomyosarkomen berichtet wurde [84, 101]. Schittenhelm et al. wiesen dabei ASPP2 κ in 30- 50% der Leukämiepatientenproben nach [84]. In den analogen Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine signifikant höhere ASPP2 κ -Expression im Vergleich zu gesundem Kolongewebe in 5 von 11 Proben (45%) gefunden. Allerdings ist die Anzahl der untersuchten Kolonproben zu gering, um allgemeine Aussagen treffen zu können.

Betrachtet man die ASPP2 κ -Expression zwischen verschiedenen Patienten mit diagnostiziertem KRK, so ergibt sich eine enorme Varianz der ASPP2 κ -Level. Dieses reicht von bis zu 10-fach höheren ASPP2 κ -Expressionsleveln im kolorektalen Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten tumorfreien Gewebe bis hin zu Nicht-Expressoren für ASPP2 κ . Allerdings mag auch die Beschreibung „tumorfrees Gewebe“ zu Fehlinterpretationen führen. Die von

uns nachgewiesene Stressinduzierbarkeit könnte im benachbarten, tumorfreien noch gesunden Gewebe eventuell durch Entzündungsreaktion zu erhöhten ASPP2k-Leveln führen und so die direkte Beurteilbarkeit erschweren.

Da für die Entstehung von fortgeschritteneren Tumorstadien mit Metastasen das Überwinden der p53-Signalkaskade ein Schlüsselereignis darstellt und Überexpression von ASPP2k unseren Untersuchungen zufolge möglicherweise zu einer Inaktivierung von p53 führt, liefern die hier gewonnenen Daten Hinweise für eine entscheidende Rolle von ASPP2k in der Tumorprogression [121]. Die Patientendaten sind dabei ein Anhaltspunkt, dass erhöhte ASPP2k-Expression zu einem aggressiveren Tumor führen kann und wir vermuten, dass dies auch mit einer schlechteren klinischen Prognose für die Patienten verbunden ist. Jedoch sind hier weiterführende klinische Studien mit höheren Patientenzahlen notwendig.

Nachdem in einigen unabhängigen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression des proapoptotischen Proteins ASPP2 durch zelluläre Stressoren induziert wird, konnte Schittenhelm et al. sowie Tsintari et al. zeigen, dass auch die Expression der onkogenen Spleißvariante ASPP2k stressinduzierbar ist [84, 101, 103, 122]. So wurde in leukämischen Zellmodellen sowohl nach Behandlung mit Chemotherapie als auch nach Behandlung mit Radiotherapie ein erhöhtes ASPP2k-Expressionslevel nachgewiesen [84]. Um zu überprüfen, ob die Expression von ASPP2k auch im KRK abhängig von DNA-Stressoren ist, wurden zwei kolorektale Karzinomzelllinien über 24h bei RT inkubiert und anschließend die ASPP2k-Expressionslevel bestimmt. Im Anschluss zeigten beide Zelllinien nach 24h Inkubation bei RT ein vielfach erhöhtes ASPP2k-Level im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Obwohl im Vergleich zu Schittenhelm et al. ein anderer Zellstressor angewendet wurde, ergänzen und bestätigen die gewonnenen Ergebnisse die Beobachtungen aus Leukämieerkrankungen und decken sich mit den Erkenntnissen von Tsintari et al. in Weichteilsarkomen [84, 101].

Nachdem wir den Nachweis, dass ASPP2 κ auch im KRK exprimiert wird erbracht haben, wurde in der Folge die funktionelle Rolle einer ASPP2 κ -Expression in KRK-Zellmodellen untersucht. Hierfür wurden zwei isogene ASPP2 κ überexprimierende Modelle (namentlich DLD-1 ASPP2 κ und HCT-116 ASPP2 κ) als auch zwei Zellmodelle mit supprimierter ASPP2 κ -Expression (shASPP2 κ .DLD-1 und shASPP2 κ .HCT-116) etabliert.

Um den Einfluss von ASPP2 κ auf die Chemotherapie induzierte Induktion der Apoptose zu analysieren wurden die ASPP2 κ modifizierten Zellmodelle 48h mit Oxaliplatin behandelt und anschließend mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate bestimmt. Oxaliplatin, als etabliertes Chemotherapeutikum des FOLFOX Therapieschemas bei fortgeschrittenem KRK, gehört zu der Wirkstoffklasse der Crosslinker und führt durch Induktion von DNA-Quervernetzungen zur Hemmung der Replikation und folglich zur Apoptose [123-125].

Die Ergebnisse der durchgeführten Apoptoseuntersuchungen zeigen hierbei, dass die Expression von ASPP2 κ großen Einfluss auf die Induktion der Apoptose und somit Therapieresistenz gegen Oxaliplatin besitzt. Die hier erhobenen Daten bestätigen unsere Hypothese, dass ASPP2 κ das Ansprechen auf Therapie beeinflusst. Dies ist zumindest zum Teil auf das Fehlen der p53-Bindungsstelle dieser trunkierten Variante und die somit geringere Aktivierung von p53 zurückzuführen. Ähnliches konnten bereits Schittenhelm et al. mittels silencing-RNA in HCT-116 sowie später Tsintari et al. mittels shRNA gegen ASPP2 κ in Sarkomen nachweisen. Auch hier führte eine signifikante Suppression von ASPP2 κ mittels silencing-RNA zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika [84, 101].

Zur weiteren Spezifizierung der Rolle von ASPP2 κ im KRK wurde mit Hilfe der etablierten ASPP2 κ Zellmodelle die Proliferationskapazität unter Einfluss von ASPP2 κ untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Verdopplungszeit von ASPP2 κ überexprimierenden Zellen im Mittel 14- 16% verkürzt ist im Vergleich

zur EV-Kontrolle. Stimmig hierzu lässt sich in beiden Zelllinien mit supprimiertem ASPP2 κ eine prolongierte Verdopplungszeit von 9- 10% nachweisen. Hierbei stimmen die Verdopplungszeiten beider EV-Kontrollzelllinien der DLD-1 mit der Verdopplungszeit bei Etablierung der DLD-1 p53^{+/+} Zelllinie überein [126]. Auch die ermittelte Verdopplungszeit der EV-Kontrollen von HCT-116 entsprechen den Literaturwerten der HCT-116 p53 WT [109]. Die gewonnenen Ergebnisse, sowohl der Proliferationsanalyse mit ASPP2 κ Überexpression als auch mit ASPP2 κ Suppression, bestätigen die bisherigen Erkenntnisse von Schittenhelm et al. sowie Tsintari et al. über ASPP2 κ in Leukämien sowie Weichteilsarkomen und zeigen, dass ASPP2 κ erheblichen Einfluss auf das Proliferationsbestreben der kolorektalen Tumorzellen besitzt [84, 101]. Über welche zugrundeliegenden Mechanismen die Proliferation im Detail durch ASPP2 κ reguliert wird, lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilen und weitere Untersuchungen sind in der Zukunft notwendig.

Auf Grund der Erkenntnisse, dass ASPP2 κ einen erheblichen Einfluss auf sowohl die Induktion der Apoptose als auch auf das Proliferationsverhalten in kolorektalen Karzinomzellen innehat, wurde in einem weiteren Schritt das Migrationsverhalten der kolorektalen Tumorzellen in Abhängigkeit von ASPP2 κ untersucht.

Um die Zellmigration entlang eines Chemogradienten zu untersuchen, wurde mit den etablierten Zellmodellen zunächst ein Transwell Migrationsassay durchgeführt. Eine Überexpression von ASPP2 κ führte hierbei zu einem signifikant gesteigerten Bestreben zur Migration durch die Transwell Membran. Entsprechend bestätigte eine Suppression von ASPP2 κ in beiden Zellmodellen ein attenuiertes Migrationsbestreben.

Zur weiteren Verifikation wurde in einem zweiten Versuchsaufbau die Zellmigration mittels eines Wundheilungsassays untersucht. Auch in diesem Ansatz konnte bestätigt werden, dass ASPP2 κ bei Überexpression zu einer schnelleren Wundschließung und dementsprechend zu einem aggressiveren Migrationsverhalten beiträgt. Konsistent hierzu wiesen DLD-1 Zellen mit

supprimiertem ASPP2k eine verlangsamte Wundschließung und folglich ein geringeres Migrationsbestreben auf. Stimmig hierzu wurde auch in Sarkomen mit herunterreguliertem ASPP2k eine reduzierte Wundheilung beschrieben [101].

Die Auswertung der Wundheilungsassays wurde unter Berücksichtigung der Zellverdopplungszeit durchgeführt. Die berechneten Migrationsraten sind somit als Ergänzung zu den Erkenntnissen des Transwell Migrationsassays zu sehen und ein erneuter Hinweis dafür, dass ASPP2k im KRK zu einem aggressiveren Tumorwachstum mit erhöhtem Bestreben zur Migration führt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ASPP2k in kolorektalen Karzinomen nachweisbar ist und im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant überexprimiert wird. Einzelfallanalysen zeigten dabei große interindividuelle Schwankungen. Bei ca. 45% der Tumorproben ließ sich eine signifikante Überexpression nachweisen. Hier sind zukünftig Screenings an definierten Patientenkollektiven notwendig, um ein umfassenderes Bild zu erlangen. Weiter konnten wir auch nachweisen, dass die ASPP2k-Expression *in vitro* dynamisch und stressinduzierbar ist. Funktionelle Untersuchungen von ASPP2k zeigten, dass ASPP2k in den untersuchten kolorektalen Karzinomzellmodellen zu einem Überlebensvorteil bei der Behandlung mit Chemotherapeutika führt, proliferationssteigernd wirkt und die Tumorzellen ein verstärktes Bestreben zur Migration aufweisen. Dem gegenüber führt die effektive Suppression von ASPP2k zu einer Reduktion der Proliferations- und Migrationsfähigkeit sowie zu einem verbesserten Therapieansprechen bei Behandlung mit Chemotherapeutika.

Da ASPP2k die C-terminale p53-Bindungsdomäne fehlt, welche von Ahn et al. bzw. Rotem und Kollegen als fundamental für die Interaktion zwischen ASPP2 WT und p53 beschrieben wird, scheint es wahrscheinlich, dass hierdurch die proliferative und -migratorische sowie antiapoptotische Funktion von ASPP2k durch eine gestörte Interaktion mit p53 bedingt ist [127, 128]. Dies würde implizieren, dass hohe Level von ASPP2k die ASPP2-p53 Interaktion,

welche normalerweise zur Apoptose führt, antagonisieren könnten. Gestützt wird unsere Annahme, durch die oben beschriebenen Daten. Eine erhöhte ASPP2 κ -Expression schwächt die Chemotherapie- induzierte Apoptose und ein ASPP2 κ spezifischer knock-down führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemotherapie- induzierter Apoptose. Diese Ergebnisse, erweitert durch die Erkenntnisse der Proliferations- und Migrationsanalysen, lassen vermuten, dass ASPP2 κ ein wichtiger inhibitorischer Mechanismus im p53-Signalweg sein könnte und so zu einem aggressiveren Tumor mit schlechterem klinischem Verlauf führt. Der zugrundeliegende Mechanismus, wie ASPP2 κ die p53-Signalkaskade beeinflusst, bleibt weiterhin unklar und ist aktuell Gegenstand unserer weiterführenden Untersuchungen. Ein potenzieller Wirkmechanismus besteht darin, dass ASPP2 κ an ASPP2 WT bindet und hierdurch eine Interaktion von ASPP2 WT mit p53 unterbindet. Hinweise für diese mögliche ASPP2 κ - ASPP2 Interaktion liefern die Strukturanalysen von Rotem et al., welche eine ASPP2- ASPP2 Interaktion und Bindung beschreiben und unseren Untersuchungen nach ASPP2 κ diese potenziellen Bindungsdomänen weiterhin aufweist [129, 130]. Es ist außerdem denkbar, dass ASPP2 κ weitere Bindungsmöglichkeiten zu anderen Proteinen besitzt und hierdurch eine indirekte Beeinflussung der p53-Signalkasakade möglich ist. Hervorzuheben ist hierbei die Interaktion zwischen ASPP2 WT und den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-x, welche zu einer Balance zwischen pro- und antiapoptotischer Aktivität der Proteine führt [131]. Bei ASPP2 κ ist jedoch die hierfür notwendige Interaktionsstruktur höchstens noch teilweise vorhanden und weitere strukturelle Untersuchungen sind notwendig, um ein vollständigeres Bild über die regulatorische Funktionsweise von ASPP2 κ zu erhalten.

Interessanterweise konnten in dieser Arbeit die Erkenntnisse von Schittenhelm et al. sowie Tsintari et al. über die Stressinduzierbarkeit der ASPP2 κ -Expression in Leukämien und Sarkomen auch in KRK bestätigt werden [84, 101]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine ASPP2 κ -Überexpression zu einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapie führt. Werden diese beiden Erkenntnisse gemeinsam betrachtet, ergibt sich hieraus die Möglichkeit, dass der alternative Splicingvorgang von ASPP2 ein potenzieller Mechanismus bei

der Entstehung von Resistenzen im Verlauf einer Therapie ist, welcher unabhängig von genomischen Mutationen ist.

Durch die hohe Prävalenz von ASPP2k in kolorektalen Karzinomgewebeproben und der proproliferativen, promigratorischen und antiapoptotischen Eigenschaft der Tumorzellen bei ASPP2k-Überexpression, ergibt sich die Chance ASPP2k zukünftig als klinisch wertvollen prognostischen Marker zu etablieren. Die erhobenen Daten demonstrieren dabei, dass eine Ergänzung der bisherig etablierten Mutationsanalysen um Screenings auf ASPP2k, weitere wichtige Informationen für die Prognoseabschätzung bei Patienten mit KRK liefern könnte.

Schließlich besteht die Möglichkeit ASPP2k zukünftig als molekulares Ziel einer individualisierten und zielgerichteten Therapie zu etablieren. Grund zu dieser Annahme liefern die Ergebnisse dieser Arbeit, da im Zellmodell durch eine suffiziente Suppression von ASPP2k ein antiproliferativer und antimigratorischer Effekt nachgewiesen werden konnte sowie ASPP2k knock-down Zellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapie aufwiesen. Durch Reduzierung der ASPP2k-Expression oder Proteinlevels durch beispielsweise Gensilencing oder silencing-RNA wäre eine neue Behandlungsform beim KRK denkbar.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten vielversprechende Daten gewonnen werden, welche erstmals am 05. November 2021 in *Frontiers in Molecular Biosciences* veröffentlicht wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit definieren dabei die Rolle der onkongen Spleißvariante ASPP2k im KRK und liefern hierbei richtungsweisende Erkenntnisse, welche den Grundstein für weiterführende experimentelle sowie klinische Studien an definierten Patientenkohorten legen.

5 Zusammenfassung

Das KRK ist trotz immenser Bemühungen und Fortschritte im Bereich der Vorsorge und Therapie weiterhin eine der häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit zunehmendem Alter an, was unter Berücksichtigung der demographischen Entwicklung zu einer stetig steigenden Inzidenz des KRK führt. Nur etwa 50% der Tumoren weisen dabei eine Mutation im Tumorsuppressor p53 nach, weshalb die Suche nach weiteren inaktivierenden Mechanismen angezeigt ist. Einen wichtigen Stellenwert in der Regulation der p53-Signalkaskade besitzt hierbei die ASPP-Proteinfamilie, welche aus zwei proapoptischen Regulationsproteinen ASPP1 und ASPP2 und einem antiapoptischen Mitglied iASPP besteht. Mit der Entdeckung der Spleißvariante von ASPP2, ASPP2 κ wurde in Leukämien ein weiteres Regulationsprotein, jedoch mit onkogenem Potenzial, beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen ASPP2 κ im KRK nachgewiesen und zum anderen die Rolle von ASPP2 κ im KRK charakterisiert werden.

Für einen *in vivo* Nachweis von ASPP2 κ im KRK wurden kolorektale Karzinomgewebeproben auf eine ASPP2 κ -Expression untersucht und gesunden Kolonproben gegenübergestellt. Im weiteren Verlauf wurden für die *in vitro* Charakterisierung der Rolle von ASPP2 κ im KRK vier isogene kolorektale Karzinomzellmodelle, zwei mit überexprimiertem ASPP2 κ und zwei mit ASPP2 κ Suppression, etabliert und anschließend die Auswirkung der ASPP2 κ -Expression auf die Apoptoseinduktion, die Proliferation und die Migration untersucht. Weiter erfolgte eine ASPP2 κ spezifische Expressionsanalyse zur Untersuchung der dynamischen Stressinduzierbarkeit von ASPP2 κ im KRK.

Bei den Analysen der kolorektalen Karzinomgewebeproben von Patienten konnte in 45% der kolorektalen Tumorgewebeprobe eine heraufregulierte ASPP2 κ -Expression nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die ASPP2 κ -Expression hohen interindividuellen Schwankungen aufweist.

Zudem ließ sich bestätigen, dass die ASPP2k-Expression im KRK dynamisch und durch Zellstressoren induzierbar ist.

Weiter konnten wir zeigen, dass ASPP2k einen erheblichen Einfluss auf die Aggressivität der Tumorerkrankung hat. So führte eine ASPP2k-Überexpression zu einer abnorm gesteigerten Proliferationsfähigkeit, einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika sowie zu einem deutlich erhöhten Migrationsbestreben.

Analysen der ASPP2k defizienten kolorektalen Tumorzellen zeigten konträr hierzu eine verminderte Proliferationsrate, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Chemotherapie sowie ein abgeschwächtes Migrationspotenzial.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir somit zeigen, dass ASPP2k an der Regulation von Proliferation, Apoptose und Migration im KRK maßgeblich beteiligt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ASPP2k im KRK nachweisbar ist und durch sein onkogenes Potenzial in vielerlei Hinsicht großen Einfluss auf die Aggressivität des KRK besitzt. Diese Erkenntnisse bilden den Grundstein für zukünftige experimentelle sowie klinische Studien.

6 Literaturverzeichnis

1. Rieger, I., et al., *ASPP2k Is Expressed In Human Colorectal Carcinoma And Promotes Chemotherapy Resistance And Tumorigenesis*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021. **8**.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. 13 ed. 2021, Berlin.
3. Haug, U., *Aktueller Stand der Evidenz und Entwicklung der Darmkrebsfrüherkennung in Deutschland*. *Bundesgesundheitsblatt*, 2018. **61**(12): p. 1513-1516.
4. Wittekind C and M. HJ, *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*. 8 ed. 2017, Weinheim: Wiley-VCH.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), , *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1*. 2019.
6. Majek, O., et al., *Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century*. *British Journal of Cancer*, 2012. **106**(11): p. 1875-1880.
7. Aubrey, B.J., et al., *How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?* *Cell Death and Differentiation*, 2018. **25**: p. 104-113.
8. Kasthuber, E.R. and S.W. Lowe, *Putting p53 in Context*. *Cell*, 2017. **170**(6): p. 1062-1078.
9. Zenz, T., et al., *Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia—the role of the p53 pathway*. *Leukemia & Lymphoma*, 2009. **50**(3): p. 510-513.
10. Iacopetta, B., *TP53 Mutation in Colorectal Cancer*. *Human Mutation*, 2003. **21**: p. 271-276.
11. Li, X.L., et al., *P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation*. *World Journal of Gastroenterol*, 2015. **21**(1): p. 84-93.
12. Reichrath, J., *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020, Cham: Springer.
13. Malhotra, J., et al., *Risk factors for lung cancer worldwide*. *European Respiratory Journal*, 2016. **48**: p. 889-902.
14. Klebe, S., et al., *Asbestos, Smoking and Lung Cancer: An Update*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019. **17**.
15. Taylor, D.P., et al., *Population-Based Family History–Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 877-885.
16. Liang, P.S., T.-Y. Chen, and E. Giovannucci, *Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis*. *International Journal of Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2406-2415.
17. Fedirko, V., et al., *Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies*. *Annals of Oncology*, 2011. **22**(9): p. 1958-1972.
18. Bardou, M., A.N. Barkun, and M. Martel, *Obesity and colorectal cancer*. *Gut*, 2013. **62**(6): p. 933-947.

19. González, N., et al., *2017 update on the relationship between diabetes and colorectal cancer: epidemiology, potential molecular mechanisms and therapeutic implications*. *Oncotarget*, 2017. **8**(11): p. 18456-18485.
20. Chan, D.S.M., et al., *Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(6): p. e20456.
21. Sonnenberg, A. and R.M. Genta, *Helicobacter pylori is a risk factor for colonic neoplasms*. *American Journal of Gastroenterology*, 2013. **108**(2): p. 208-215.
22. Kostic, A.D., et al., *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma*. *Genome Research*, 2012. **22**: p. 292-298.
23. Stidham, R.W. and P.D.R. Higgins, *Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease*. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 2018. **31**(3): p. 168-178.
24. Jess, T., C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, *Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012. **10**(6): p. 639-645.
25. Boyle, T., et al., *Physical Activity and Risks of Proximal and Distal Colon Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2012. **104**(20): p. 1548-1561.
26. Brenner, H., et al., *Protection From Colorectal Cancer After Colonoscopy: A Population-Based, Case-Control Study*. *Annals of Internal Medicine*, 2011. **154**: p. 22-30.
27. Sadanandam, A., et al., *A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy*. *Nature Medicine*, 2013. **19**(5): p. 619-625.
28. De Sousa E Melo, F., et al., *Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions*. *Nature Medicine*, 2013. **19**(5): p. 614-618.
29. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2044-2058.
30. Lynch, H.T. and A. De la Chapelle, *Hereditary colorectal cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(10): p. 919-932.
31. Sinicrope, F.A., *Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2018. **379**(8): p. 764-773.
32. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, *Familial adenomatous polyposis*. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2009. **4**: p. 22.
33. Schmoll, H.J., K. Höffken, and K. Possinger, *Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie* 4ed. 2009, Berlin: Springer
34. Raymond, D. and M.D. Ruddon, *Cancer Biology*. 2007: Oxford University Press.
35. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The multistep nature of cancer*. *Trends in Genetics*, 1993. **9**(4): p. 138-141.
36. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis*. *cell*, 1990. **61**(5): p. 759-767.

37. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-1558.
38. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from Hereditary Colorectal Cancer*. Cell, 1996. **87**: p. 159-170.
39. Fearon, E.R., *Molecular Genetics of Colorectal Cancer*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011. **6**: p. 479-507.
40. Bos, J.L., *The ras gene family and human carcinogenesis*. Mutation Research, 1988. **195**: p. 255-271.
41. Jones, S., et al., *Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution*. PNAS, 2008. **105**(11): p. 4283-4288.
42. Anthony, D.A., et al., *Microsatellite Instability, Apoptosis, and Loss of p53 Function in Drug-resistant Tumor Cells*. Cancer Research, 1996. **56**: p. 1374-1381.
43. Strum, W.B., *Colorectal Adenomas*. New England Journal of Medicine, 2016. **374**: p. 1065-1075.
44. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite Instability in Colorectal Cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**: p. 2073-2087.
45. Poynter, J.N., et al., *Molecular Characterization of MSI-H Colorectal Cancer by MLH1 Promoter Methylation, Immunohistochemistry, and Mismatch Repair Germline Mutation Screening*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention, 2008. **17**(11): p. 3208-3215.
46. Capel, E., J.F. Fléjou, and R. Hamelin, *Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis*. Oncogene, 2007. **26**: p. 7596-7600.
47. Li, Z.N., et al., *BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy*. Gastroenterol Report, 2020. **8**(3): p. 192-205.
48. Douillard, J.Y., et al., *Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(11): p. 1023-1034.
49. Bokemeyer, C., et al., *FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. European journal of cancer, 2015. **51**: p. 1243-1252.
50. Cremolini, C., et al., *FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study*. Lancet Oncology, 2015. **16**: p. 1306-1315.
51. Tran, B., et al., *Impact of BRAF Mutation and Microsatellite Instability on the Pattern of Metastatic Spread and Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer*. Cancer, 2011. **117**(20): p. 4623-4632.
52. Tabernero, J., et al., *Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study*. Journal of Clinical Oncology, 2021. **39**(4): p. 273-284.
53. André, T., et al., *Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(23): p. 2207-2218.

54. van der Stok, E.P., et al., *Surveillance after curative treatment for colorectal cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2017. **14**(5): p. 297-315.
55. van Gijn, W., et al., *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**: p. 575-582.
56. Niazi, S., M. Purohit, and J.H. Niazi, *Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018. **158**: p. 7-24.
57. Lane, D.P., *p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-16.
58. DeLeo, A.B., et al., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. PNAS, 1979. **76**(5): p. 2420-2424.
59. Horn, H.F. and K.H. Vousden, *Coping with stress: multiple ways to activate p53*. Oncogene, 2007. **26**: p. 1306-1316.
60. Biegging, K.T., S.S. Mello, and L.D. Attardi, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. Nature Reviews Cancer, 2014. **14**(5): p. 359-370.
61. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**: p. 307-310.
62. Espinosa, J.M., R.E. Verdun, and B.M. Emerson, *p53 Functions through Stress- and Promoter- Specific Recruitment of Transcription Initiation Components before and after DNA Damage*. Molecular Cell, 2003. **12**(4): p. 1015-1027.
63. Ho, J. and S. Benchimol, *Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**(4): p. 404-408.
64. Speidel, D., *Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death*. Trends in Cell Biology, 2010. **20**(1): p. 14-24.
65. Shaw, P.H., *The Role of p53 in Cell Cycle Regulation*. Pathology - Research and Practice, 1996. **192**: p. 669-675.
66. Steller, H., *Mechanisms and Genes of Cellular Suicide*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1445-1449.
67. Chipuk, J.E., et al., *Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1010-1014.
68. Ozaki, T. and A. Nakagawara, *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers*. Cancers 2011. **3**: p. 994-1013.
69. Baugh, E.H., et al., *Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?* Cell Death and Differentiation 2018. **25**: p. 154-160.
70. Vousden, K.H. and C. Prives, *Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53*. Cell, 2009. **137**(3): p. 413-31.
71. Wallace-Brodeur, R.R. and S.W. Lowe, *Clinical implications of p53 mutations*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999. **54**: p. 64-75.
72. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy*. Cell, 2002. **108**: p. 153-164.

73. Hainaut, P. and M. Hollstein, *p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations*. *Advances in Cancer Research*, 1999. **77**: p. 81-137.
74. Samuels-Lev, Y., et al., *ASPP Proteins Specifically Stimulate the Apoptotic Function of p53*. *Molecular Cell*, 2001. **8**: p. 781-794.
75. Sullivan, A. and X. Lu, *ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes*. *British Journal of Cancer*, 2007. **96**: p. 196-200.
76. Trigianti, G. and X. Lu, *ASPP and cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**: p. 217–226.
77. Gorina, S. and N.P. Pavletich, *Structure of the p53 Tumor Suppressor Bound to the Ankyrin and SH3 Domains of 53BP2*. *Science*, 1996. **274**(5289): p. 1001-1005.
78. Bergamaschi, D., et al., *ASPP1 and ASPP2: Common Activators of p53 Family Members*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. **24**(3): p. 1341-1350.
79. Slee, E.A. and X. Lu, *The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage*. *Toxicology Letters*, 2003. **139**: p. 81-87.
80. Vives, V., E.A. Slee, and X. Lu, *ASPP2: A Gene that Controls Life and Death in Vivo*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(19): p. 2187-2190.
81. Bergamaschi, D., et al., *iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human*. *Nature Genetics*, 2003. **33**: p. 162-167.
82. Liu, Z.-J., X. Lu, and S. Zhong, *ASPP-Apoptotic specific regulator of p53*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005. **1756**: p. 77-80.
83. Mori, T., et al., *Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines*. *FEBS Letters*, 2000. **465**: p. 124-128.
84. Schittenhelm, M.M., et al., *Alternative splicing of the tumor suppressor ASPP2 results in a stress-inducible, oncogenic isoform prevalent in acute leukemia*. *EBioMedicine*, 2019. **42**: p. 340-351.
85. Liu, Z.-J., et al., *Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53*. *FEBS Letters*, 2005. **579**(7): p. 1587-1590.
86. Mori, S., et al., *p53 Apoptotic Pathway Molecules Are Frequently and Simultaneously Altered in Non-small Cell Lung Carcinoma*. *Cancer*, 2004. **100**(8): p. 1673-1682.
87. Schittenhelm, M.M., et al., *Attenuated Expression of Apoptosis Stimulating Protein of p53-2 (ASPP2) in Human Acute Leukemia Is Associated with Therapy Failure*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(11): p. e80193.
88. Zhang, X., et al., *The expression of iASPP in acute leukemias*. *Leukemia Research*, 2005. **29**(2): p. 179-183.
89. Li, S., et al., *Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP*. *Oncology Reports*, 2012. **28**: p. 133-140.
90. Kampa, K.M., M. Bonin, and C.D. Lopez, *New insights into the expanding complexity of the tumor suppressor ASPP2*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(18): p. 2871-2876.
91. Iwabuchi, K., et al., *Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53*. *PNAS*, 1994. **91**: p. 6098-6102.

92. Takahashi, N., et al., *Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **315**: p. 434-438.
93. Thukral, S.K., et al., *Distinct Residues of Human p53 Implicated in Binding to DNA, Simian Virus 40 Large T Antigen, 53BP1, and 53BP2*. Molecular and Cellular Biology, 1994. **14**(12): p. 8315-8321.
94. Tidow, H., et al., *Effects of Oncogenic Mutations and DNA Response Elements on the Binding of p53 to p53-binding Protein 2 (53BP2)*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(43): p. 32526-32533.
95. Naumovski, L. and M.L. Cleary, *The p53-Binding Protein 53BP2 Also Interacts with Bcl2 and Impedes Cell Cycle Progression at G2/M*. Molecular and Cellular Biology, 1996. **16**(7): p. 3884-3892.
96. Iwabuchi, K., et al., *Stimulation of p53-mediated Transcriptional Activation by the p53-binding Proteins, 53BP1 and 53BP2*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(40): p. 26061-26068.
97. Yang, J.-P., et al., *NF- κ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2*. Oncogene, 1999. **18**: p. 5177-5186.
98. Tian, L., et al., *Downregulation of ASPP2 promotes gallbladder cancer metastasis and macrophage recruitment via aPKC- ι /GLI1 pathway*. Cell Death & Disease, 2018. **9**: p. 1115.
99. Lossos, I.S., et al., *Apoptosis Stimulating Protein of p53 (ASPP2) Expression Differs in Diffuse Large B-cell and Follicular Center Lymphoma: Correlation with Clinical Outcome*. Leukemia & lymphoma, 2002. **43**(12): p. 2309-2317.
100. Cobleigh, M.A., et al., *Tumor Gene Expression and Prognosis in Breast Cancer Patients with 10 or More Positive Lymph Nodes*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(24): p. 8623-8631.
101. Tsintari, V., et al., *Alternative splicing of Apoptosis Stimulating Protein of TP53-2 (ASPP2) results in an oncogenic isoform promoting migration and therapy resistance in soft tissue sarcoma (STS)*. BMC Cancer, 2022. **22**: p. 725.
102. Kampa, K.M., et al., *Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds*. PNAS, 2009. **106**(11): p. 4390-4395.
103. Lopez, C.D., et al., *Proapoptotic p53-Interacting Protein 53BP2 Is Induced by UV Irradiation but Suppressed by p53*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(21): p. 8018-8025.
104. Wang, Y., et al., *ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells*. Cell Death and Differentiation, 2013. **20**: p. 525-534.
105. Liang, B., et al., *ASPP2 inhibits tumor growth by repressing the mevalonate pathway in hepatocellular carcinoma*. Cell Death & Disease, 2019. **10**: p. 830.
106. Prokocimer, M., A. Molchadsky, and V. Rotter, *Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy*. Blood, 2017. **130**(6): p. 699-712.

107. Dexter, D.L., et al., *Heterogeneity of Cancer Cells from a Single Human Colon Carcinoma*. The American Journal of Medicine, 1981. **71**: p. 949-956.
108. Trainer, D.L., et al., *Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines*. International Journal of Cancer, 1988. **41**: p. 287-296.
109. Brattain, M.G., et al., *Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colon Carcinoma 1*. Cancer Research, 1981. **41**: p. 1751-1756.
110. Botchkina, I.L., et al., *Phenotypic Subpopulations of Metastatic Colon Cancer Stem Cells: Genomic Analysis*. Cancer Genomics & Proteomics, 2009. **6**: p. 19-30.
111. Sena-Esteves, M., et al., *Single-Step Conversion of Cells to Retrovirus Vector Producers with Herpes Simplex Virus–Epstein-Barr Virus Hybrid Amplicons*. Journal of Virology, 1999. **73**(12): p. 10426-10439.
112. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Zell-und Gewebekultur*. Zell-und Gewebekultur. Vol. 10. 2013, Berlin: Springer. 127.
113. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Current Protocols in Immunology, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
114. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An Overview of Cell Death*. American Journal of Pathology, 1995. **146**(1): p. 3-15.
115. Allen, R.T., W.J. Hunter III, and D.K. Agrawal, *Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1997. **37**: p. 215-228.
116. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. Journal of Immunology, 1992. **148**: p. 2207-2216.
117. Andree, H., et al., *Clustering of Lipid-bound Annexin V May Explain Its Anticoagulant Effect*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(25): p. 17907-17912.
118. Koopman, G., et al., *Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-1420.
119. Arnold, M., et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. Gut, 2017. **66**: p. 683-691.
120. Wilson, P.M., M.J. LaBonte, and H.-J. Lenz, *Molecular Markers in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer*. The Cancer Journal, 2010. **16**(3): p. 262-272.
121. Huang, D., et al., *Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis*. Cancer and Metastasis Reviews, 2018. **37**: p. 173-187.
122. Zhu, Z., et al., *Control of ASPP2/53BP2L Protein Levels by Proteasomal Degradation Modulates p53 Apoptotic Function*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(41): p. 34473-80.
123. Raymond, E., et al., *Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin*. Molecular Cancer Therapeutics, 2002. **1**: p. 227-235.
124. Pires, I.M., T.H. Ward, and C. Dive, *Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors*. British Journal of Pharmacology, 2010. **159**(6): p. 1326-1338.

125. Raymond, E., et al., *Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity*. Seminars in Oncology, 1998. **25**: p. 4-12.
126. Dexter, D.L., J.A. Barbosa, and P. Calabresi, *N,N-Dimethylformamide-induced Alteration of Cell Culture Characteristics and Loss of Tumorigenicity in Cultured Human Colon Carcinoma Cells*. Cancer Research, 1979. **39**: p. 1020-1025.
127. Jinwoo, A., et al., *Insight into the Structural Basis of Pro- and Antiapoptotic p53 Modulation by ASPP Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(20): p. 13812-13822.
128. Rotem, S., C. Katz, and A. Friedler, *Insights into the structure and protein-protein interactions of the pro-apoptotic protein ASPP2*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**(5): p. 966-969.
129. Rotem-Bamberger, S., C. Katz, and A. Friedler, *Regulation of ASPP2 Interaction with p53 Core Domain by an Intramolecular Autoinhibitory Mechanism*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e58470.
130. Rotem, S., et al., *The Structure and Interactions of the Proline-rich Domain of ASPP2*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(27): p. 18990-18999.
131. Katz, C., et al., *Molecular basis of the interaction between the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and the proapoptotic protein ASPP2*. PNAS, 2008. **105**(34): p. 12277-12282.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen in der Abteilung II für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Marcus Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Dissertationsstudie erfolgte durch Herrn Professor Dr. med. Marcus Schittenhelm in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm (Leiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Hämatologie und Onkologie) und mich selbst. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Dr. rer. nat. Vasileia Tsintari vollständig und eigenständig von mir durchgeführt. Ausnahmen hiervon sind die Etablierung sowie Testung der ASPP2k herunterregulierten HCT-116, welche durch Frau PD Dr. Kampa-Schittenhelm durchgeführt wurden.

Die Datenanalyse und statistische Auswertung erfolgten nach Anleitung durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbstständig unter Anleitung und Korrektur durch Herrn Professor Dr. med. Marcus Schittenhelm und Frau PD Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die aus der Originalpublikation übernommenen und modifizierten Abbildungen wurden ebenso ursprünglich von mir selbst unter Aufsicht von Herrn Professor Dr. med. Marcus Schittenhelm sowie Dr. rer. nat. Vasileia Tsintari entworfen. Weitere Informationen zum Anteil der Autoren an der Originalpublikation finden sich im Abschnitt „Author Contributions“ der Publikation.

Tübingen, den 08.02.2023

8 Liste der Veröffentlichung

Rieger, I., et al., *ASPP2 κ Is Expressed In Human Colorectal Carcinoma And Promotes Chemotherapy Resistance And Tumorigenesis*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021. **8**.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Professor Dr. Marcus Schittenhelm für die Bereitstellung des Forschungsthemas und Ermöglichung meiner Promotion. Weiter möchte ich mich bei ihm und meiner Betreuerin im Labor Frau Privatdozentin Dr. Kerstin Kampa-Schittenhelm für das große Interesse an meiner Arbeit und hervorragenden Betreuung bedanken. Das große Interesse an meiner Arbeit und der konstruktive Austausch haben entscheidend zu dieser Dissertation beigetragen und aus meiner Perspektive für eine vollumfängliche Betreuung gesorgt.

Als weitere Betreuerin und Ansprechpartnerin im Labor möchte ich mich ebenso bei Dr. Vasileia Tsintari bedanken, die mir bei allen Unwägbarkeiten stets zur Seite stand und mir die wichtigsten Handgriffe im Labor beigebracht hat.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Fend der Universitätspathologie Tübingen sowie beim Comprehensive Cancer Center Tübingen-Stuttgart für die Aufbereitung und Zurverfügungstellung der Kolongewebebeurteilungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsprojekts. Zuletzt danke ich meiner Familie, Partnerin und Freunden für ihre Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.