

Aus der II. Medizinischen Klinik (AG Burgermeister)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Ebert)

Die Beeinflussung zentraler Signalkaskaden von Inflammation und
kolorektaler Karzinogenese durch die Lipidphosphatase
Myotubularin-Related Protein-7

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Torsten Christian Schroeder

aus
Kiel
2022

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referentin: PD Dr.rer.nat. Elke Burgermeister

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Kolorektale Karzinome: Entstehung und Klassifikation	3
1.2 Der RAS-Signalweg und Mutationen in kolorektalen Karzinomen.....	5
1.2.1 Metabolische Wirkung	7
1.2.2 Immunologische Wirkung	8
1.2.3 Metastasierung	8
1.3 Der PI3-Kinase-Signalweg	8
1.4 Das Serum <i>Response</i> Element.....	9
1.5 Der WNT-β-Catenin-Signalweg.....	9
1.5.1 β -Catenin-abhängiger WNT-Signalweg	10
1.5.2 β -Catenin-unabhängige Signalwege.....	12
1.6 APC-Mutationen.....	12
1.6.1 Veränderter WNT-Signalweg im KRK.....	12
1.6.2 Struktur des APC Proteins.....	12
1.6.3 APC und der WNT- β -Catenin-Signalweg.....	13
1.6.4 Die Rolle von APC-Mutationen in zielgerichteten Therapien	14
1.6.5 Bezug des WNT- β -Catenin- und EGFR-RAS-Signalweges in KRK...	15
1.6.6 WNT-Aktivierung durch MEK1/2-Inhibitoren	16
1.7 Peroxisomen-Proliferator-Aktivierende Rezeptoren	16
1.7.1 Struktur von PPAR γ	17
1.7.2 PPAR γ	17
1.7.3 Antiproliferative Wirkungen von PPAR γ	17
1.7.4 Glitazone	18
1.7.5 PPAR γ und WNT	19
1.8 Die PD-L1-Expression als Ausdruck der Immunevasion von Tumoren	19

1.8.1	Regulation	20
1.8.2	Mögliche Interaktion von PD-L1 und PPAR γ	20
1.8.3	Induzierte Verstärkung der PD-L1-Expression	21
1.9	NFκB	21
1.10	Myotubularine	22
1.10.1	Struktur der Myotubularine	22
1.10.2	Subzelluläre Lokalisation und Klassifikation	24
1.10.3	Regulation	24
1.10.4	Zelluläre Funktion und assoziierte Erkrankungen.....	24
1.10.5	MTMR7.....	25
1.11	Ziel der Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1	Materialien.....	28
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	28
2.1.2	Grundlegende Materialien für die Zellkultur	28
2.1.3	Zelllinien	28
2.1.4	Transfektionsversuche.....	29
2.1.5	Stimulantien.....	29
2.1.6	Immunhistochemie.....	30
2.1.7	Western Blot	30
2.1.8	Kits.....	30
2.1.9	Antikörper	31
2.1.10	Geräte	31
2.1.11	Verbrauchsmaterialien im Labor.....	32
2.1.12	Software	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.2	Transfektion der Zellen.....	33
2.2.3	Luziferase Reporter Test	33
2.2.4	Herstellung der Zelllysate für den Nachweis von Phosphoproteinen.	34
2.2.5	Herstellung der Lysate für eine subzelluläre Fraktionierung	35
2.2.6	Western Blot	35
2.2.7	Immunhistochemie.....	36
2.3	Statistische Auswertung.....	37

3	ERGEBNISSE	38
3.1	MTMR7-CC-Peptid verstärkt die PPRE Promotoraktivität	38
3.2	Rosiglitazone und MTMR7-CC steigern die PD-L1-Promotoraktivität ..	40
3.3	Untersuchung zur Interaktion von MTMR7 und NFκB	43
3.4	MTMR7 reduziert die Aktivität des <i>Serum Response Elements</i> (SRE) .	44
3.5	SRE Aktivität nach PI3K-Inhibition	44
3.6	Immunhistochemische Auswertung von ERK1/2 im Mausmodell.	45
3.7	MTMR7 hemmt den WNT-Signalweg	47
3.7.1	MTMR7-FL verringert den Anteil von aktivem β-Catenin im Zellkern	50
3.7.2	Immunhistochemie: Nukleäres, aktives β-Catenin im Mausmodell....	52
3.8	Immunhistochemische Auswertung des Ki67-Index	53
4	DISKUSSION	55
4.1	Methodenkritik	55
4.1.1	Zellen.....	55
4.1.2	Luziferase Reporter Tests	55
4.1.3	Western Blot	55
4.1.4	Anzahl der Wiederholungen	55
4.1.5	Statistische Auswertung	56
4.1.6	Lösungsmittelkontrollen bei <i>Topflash</i> -TCF4/β-Catenin-Reportertests	56
4.2	Modell der MTMR7-KRAS-Interaktion	56
4.2.1	Mechanismen der KRAS-Inhibition durch MTMR7	57
4.3	MTMR7-Lokalisation und Auswirkung auf zentrale Signalkaskaden	60
4.4	Inhibition des WNT-β-Catenin-Signalweges durch MTMR7	60
4.4.1	Modell einer MTMR7 und PPARγ-induzierten Inhibition β-Catenins..	61
4.4.2	MTMR7-vermittelte WNT-Inhibition durch subzelluläre Lokalisation..	64
4.4.3	WNT-β-Catenin-Inhibition in <i>APC</i> -mutierten KRC-Zellen.....	67
4.5	PD-L1 Induktion durch MTMR7	68
4.6	Beeinflussung der untersuchten Signalwegen durch MTMR7	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
5.1	Hintergrund	71
5.2	Material und Methoden	71
5.3	Ergebnisse	71

5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	71
6	LEBENS LAUF	72
7	DANKSAGUNG	73
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
9	PUBLIKATIONEN.....	81
9.1	Kongressbeitrag	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Entstehung kolorektaler Karzinome	4
Abbildung 2: Der EGF-RAS-Signalweg	6
Abbildung 3: Der β -Catenin-abhängige (kanonische) WNT-Signalweg	11
Abbildung 4: Das APC-Protein und APC-Mutationen	13
Abbildung 5: Verbindungen von WNT- und RAS-Signalweg	15
Abbildung 6: Aufbau von PPAR γ [48]	17
Abbildung 7: Funktion von PD-L1	20
Abbildung 8: Mögliche Transduktion: RAS-Kaskade, PPAR γ und PD-L1	21
Abbildung 9: Aufbau der Myotubularine [79].....	23
Abbildung 10: MTMR7-CC/Rosiglitazone verstärken PPRE-Promotoraktivität.....	38
Abbildung 11: Rosiglitazone verstärkt die PD-L1-Promotoraktivität.....	41
Abbildung 12: MTMR7-CC verstärkt die PD-L1-Promotor-Aktivität	42
Abbildung 13: SW480 Zellen nach Transfektion mit NF κ B-Reportervektor	43
Abbildung 14: MTMR7-FL reduziert die SRE-Aktivität in HEK293T-Zellen.....	44
Abbildung 15: SAR405 ohne Effekt auf die SRE-Aktivität in HEK293T-Zellen	45
Abbildung 16: Immunhistochemie von ERK1/2 im Mausmodell.....	46
Abbildung 17: TCF/LEF-Promotoraktivität nach MTMR7-FL-Transfektion.....	47
Abbildung 18: TCF/LEF-Promotoraktivität nach MTMR7-CC-Behandlung	49
Abbildung 19: MTMR7-FL verringert die nukleäre, aktive β -Catenin-Fraktion	51
Abbildung 20: Mausmodell: Nukleäres β -Catenin nach MTMR7-CC-Behandlung....	52
Abbildung 21: Ki67-Index im Mausmodell nach MTMR7-CC-Behandlung	53
Abbildung 22: Ablauf der RAS-Signalkaskade an intrazellulären Vesikeln	58
Abbildung 23: Modell: MTMR7-vermittelte KRAS-Interaktion und Inhibition	59
Abbildung 24: Modelle der MTMR7-PPAR γ - β -Catenin-Interaktion in KRK.....	63
Abbildung 25: Modell: MTMR7- β -Catenin-Interaktion in APC-mutierten Zellen	65
Abbildung 26: Modell der MTMR7-PD-L1-Regulation.....	68
Abbildung 27: Mögliche und festgestellte molekulare Wechselwirkungen von PPAR γ , PD-L1, β -Catenin und KRAS mit MTMR7	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	<i>Antibody</i> (Antikörper)
AF 1	<i>Activation Function 1</i>
AF 2	<i>Activation Function 2</i>
AKT	Protein Kinase B
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant Kinase</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	Chromosomale Instabilität
CoIP	<i>Coimmunoprecipitation</i>
CpG-Inseln	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELK-1	<i>ETS Like Protein-1</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated-Kinase</i>
EtOH	Ethanol
EV	<i>Empty Vector</i> (Leervektor)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis Coli
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
GEF	<i>Guanine-nucleotide Exchange Factor</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FL	<i>Full-length</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HIF α	<i>Hypoxia inducible factor α</i>
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HSP90	Hitzeschock-Protein 90
IFN γ	Interferon γ
IRF	Interferon Regulierender Faktor
JAK	Janus Kinase
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LOI	<i>Loss of Imprinting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-ERK Kinase

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMR	<i>Mismatch-Repair</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTM	Myotubularin
MTMR	<i>Myotubularin-Related-Protein</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i> , nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase</i>
PH-GRAM	<i>Pleckstrin-Homology-Glucosyltransferase Rab-likeGTPase</i> Aktivator
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3KC	Phosphoinositid-3-Kinase Klasse
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death-Ligand 1</i>
PPAR γ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PPRE	<i>PPAR Response Element</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PtIns	Phosphatidylinositol
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RID	<i>Rac-Induced-Recruitment-Domäne</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SID	Set-Interaction-Domäne
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SRE	<i>Serum Response Element</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator Transcription</i>
TASIN- 1	<i>Truncated APC selective inhibitor-1</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor</i>
Thr	Threonin
TLE	<i>Transducin-Like Enhancer of split</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Maligne Neoplasien zählen nach kardiovaskulären Krankheitsereignissen immer noch zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland [4] und anderen Industrienationen [5]. Veränderungen des Metabolismus, wie sie durch einen westlichen Lebensstil hervorgerufen werden können, stellen dabei Risikofaktoren für beide Krankheitsgruppen dar. So überrascht es nicht, dass eine mehrstufige Prävention nicht nur kardiovaskulärer Erkrankungen, sondern auch karzinogener Krankheitsereignisse mit der Vermeidung eines risikoreichen Lebensstils durch Ernährungsumstellung, Verzicht auf schädigende Noxen und eine adäquate (zumeist intensivierete) körperliche Bewegung empfohlen wird. Bei bereits manifesten Tumorerkrankungen gilt es allerdings, immer effektivere Therapiestrategien zu entwickeln, die in Form der sogenannten „personalisierten Tumortherapie“ bereits klinische Anwendung finden. Eine kurative Behandlung kann bei soliden Tumoren durch einen multimodalen Ansatz aus klassischer Chemotherapie, Strahlentherapie und Chirurgie ermöglicht werden. Klassische Chemotherapeutika haben hierbei den Nachteil, dass sie meist nicht sehr spezifisch wirken und die Behandlungserfolge häufig durch Therapie-assoziierte Toxizität reduziert werden. Zielgerichtete Therapien gegen tumoreigene, regulatorische Strukturen auf der Basis von Antikörpern oder niedermolekularen Substanzen konnten in den letzten Jahren zusätzlich zur systemischen Chemotherapie etabliert werden und ergänzen oder ersetzen diese. Ziel ist eine im Vergleich zur systemischen Therapie verminderte Toxizität bei gutem Wirksamkeitsprofil. Das Gesamtüberleben bei vielen Tumorerkrankungen konnte dadurch bereits verbessert werden [6]. Für eine individualisierte Therapie unabdingbar war und ist die genaue Charakterisierung von molekularen Signalwegen. Insgesamt stehen diese zielgerichteten Therapieansätze aufgrund tumoreigener oder erworbener Resistenzmechanismen nur einem kleinen Teil der Patienten zur Verfügung.

In der Entstehung kolorektaler Karzinome spielen sogenannte Treibermutationen in zentralen Signalkaskaden, wie dem RAS- und dem WNT- β -Catenin Signalweg eine wichtige Rolle [7]. Eng mit der Hemmung des RAS-Signalweges verknüpft ist das Myotubularin-Related Protein-7 (MTMR7) [8]. Das Protein wurde als Interaktionspartner des antidiabetischen Kernrezeptors Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPAR γ) charakterisiert sowie eine hemmende Funktion auf Insulin-vermitteltes Zellwachstum und die intrazelluläre Signaltransduktion im kolorektalen Karzinom beschrieben [9].

Im Folgenden sollte der Einfluss der Lipidphosphatase MTMR7 in kolorektalen Tumoren vertiefend dargestellt werden. Dabei wurden verschiedene zentrale Signalkaskaden untersucht und eine mögliche klinische Relevanz diskutiert.

1.1 Kolorektale Karzinome: Entstehung und Klassifikation

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Die beginnende Entartung wird dabei von den Betroffenen häufig nicht bemerkt, weshalb breite Screeningprogramme zur Prävention etabliert sind [10].

Die Karzinogenese soll im Folgenden detailliert betrachtet werden: Neben der häufigsten Form der Tumorentstehung, der Adenom-Karzinom-Sequenz, welche in der Literatur auch als „klassischer“ Weg beschrieben wird, gibt es eine Form, bei der serratierte Adenome mit veränderten epigenetischen Eigenschaften und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zu einer invasiv malignen Tumorentität transformieren. Außerdem kommen Mischformen vor [7].

Bei der häufigsten Form der Pathogenese ist eine über viele Jahre langsam progrediente Transformation von benignen Polypen in kolorektale Tumoren zu beobachten. Nach Vogelstein und Fearon führen Ansammlungen von genetischen und epigenetischen Veränderungen dazu, dass gesunde epitheliale Drüsenzellen sich zunächst in benigne, adenomatöse Polypen umwandeln. Anschließend führen weitere Veränderungen zu histologisch weniger differenzierten Neoplasmen, bis am Ende der Adenom-Karzinom-Sequenz schließlich das invasive Karzinom steht [1, 3].

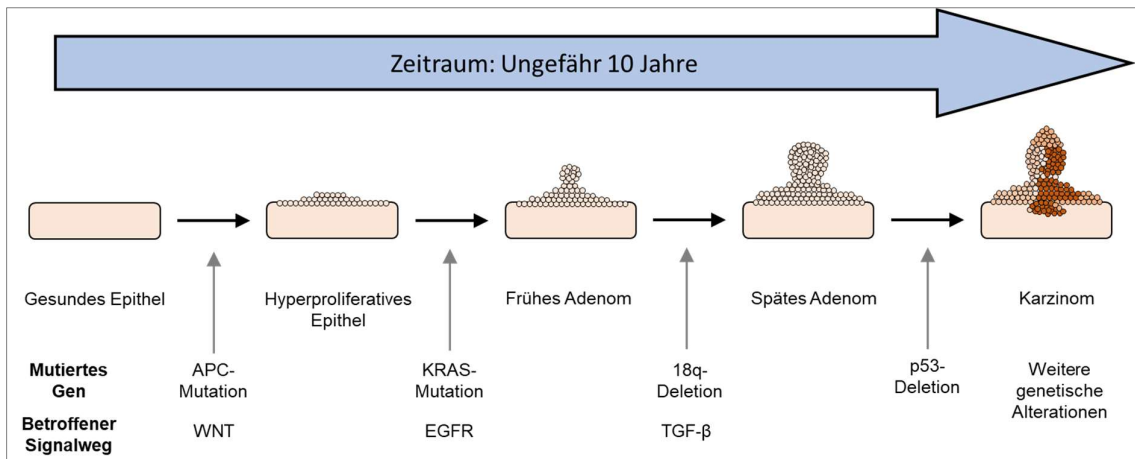


Abbildung 1: Entstehung kolorektaler Karzinome

Die Entstehung sporadischer kolorektaler Tumoren basiert auf dem gut etablierten Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein [1]. Einzelne Mutationen in den Signalwegen WNT, EGFR und TGF- β führen über einen Zeitraum von ungefähr 10 Jahren über die Hyperproliferation von Kolonepithel zu der Entstehung von Adenomen. Der Verlust des Tumorsuppressors p53 führt zu einer malignen Entartung. Weitere Mutationen können auftreten und eine Metastasierung ist möglich [1-3].

Bei der genaueren Betrachtung der genetischen und epigenetischen Veränderungen, die den Prozess der Pathogenese unterhalten, lässt sich eine Unterteilung in folgende Untergruppen vornehmen: Chromosomale Instabilität (CIN), Mikrosatelliteninstabilität (MSI), nicht-MSI Hypermutualität, aberrante DNA-Mutation und globale DNA-Hypomethylierung.

In 80-85% der kolorektalen Karzinome kommt es zu Veränderungen auf chromosomaler Ebene, es liegt eine chromosomale Instabilität (CIN) vor [7]. Dabei kommt es zu strukturellen Veränderungen von Chromosomen. Es können Aneuploidien oder Polyploidien auftreten [11]. Chromosomale Veränderungen treten meist infolge von sporadischen Veränderungen auf, können sich jedoch auch infolge der hereditären FAP entwickeln (familiäre adenomatöse Polyposis coli), bei der sich das Karzinom ebenfalls aus vorläufigen Adenomen entwickelt. Auf molekularer Ebene kommt es bei Kolonkarzinomen, bei denen eine CIN vorliegt, oft zu Mutationen im gleichnamigen APC-Tumorsuppressorgen (*adenomatous-polyposis-coli*-Protein).

In ca. 15% der Fälle liegt das kolorektale Karzinom einem serratiertem Adenom zu Grunde, welches aufgrund von Veränderungen im Mismatch-Repair-System, dem Reparatursystem der DNA zu Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) führt. Man unterscheidet auch zwischen MSS, bzw. MSI-L und MSI-H- Tumoren (MSI-*stable*, -*low*, -*high*). Eine MSI-H tritt häufig bei älteren Patienten, vor allem Frauen auf [7]. Kolorektale Karzinome lassen sich auch aufgrund ihrer Veränderungen auf molekularer Ebene unterscheiden: CpG-Inseln sind Abschnitte auf der DNA, die durch Methylierung oder Hypomethylierung zu einem Ab- oder Anschalten der Transkription einer nachgeschalteten Gen-Sequenz führen können. Bei Mikrosatelliten-Instabilen Tumoren (MSI-H) liegen Veränderungen im Bereich der CpG-Inseln häufig vor. Auch bei sporadisch auftretenden MSS- Tumoren sind sie zu finden [7, 11]. Aktivierende Mutationen in Protoonkogenen, die vermehrtes Zellwachstum zur Folge haben, sind in beiden Wegen der Karzinogenese von zentraler Bedeutung [12]. Mutationen im *KRAS*-(Proto-)Onkogen kommen fast ausschließlich in Tumoren mit intaktem DNA-Mismatch-Repair-System vor. Das hereditär auftretende Lynch-Syndrom stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar, weil es durch angeborene Mutationen im Mismatch-Repair-System zu einer MSI führt und für MSI Tumore sonst untypisch, häufig molekulare Veränderungen im *KRAS*-Signalweg zeigt [7]. Generell sind molekulare Veränderungen für eine adäquate Therapie von großer Bedeutung: Die am besten erforschten Signalwege sind die über den EGF-Rezeptor aktivierte RAS-Signalkaskade, die über die BRAF Kinase und die PI3Kinase (PI3K) proliferative Effekte vermittelt [13], ebenso wie der TGF β - und WNT- β -Catenin-Signalweg [14], welche ebenfalls proliferative Wirkungen auf molekularer Ebene vermitteln. Diese Kaskaden sind Ansatzpunkt etablierter Antikörper-basierter Therapien und weiterhin Gegenstand biomedizinischer Forschung.

1.2 Der RAS-Signalweg und Mutationen in kolorektalen Karzinomen

Im Kolorektalen Karzinom nehmen Mutationen in RAS-kodierenden Genen (*KRAS* und *NRAS*) einen wichtigen Stellenwert in der Tumorgenese ein [15-17]. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung von RAS-Proteinen durch eine Kinasekaskade vermittelt. Am Anfang dieser Kaskade steht der *epithelial growth factor receptor* (EGFR). Der EGFR wird extrazellulär durch den *epithelial growth factor* (EGF) stimuliert, dimerisiert und autophosphoryliert sich selbst. Darauf folgt eine Bindung von Adapterproteinen: Zunächst bindet SHC, dann GRB2 und schließlich SOS [18]. Durch die Adapterproteinbindung kann die weitere Signaltransduktion über RAS-Proteine stattfinden. Neben der Initiation des RAS-RAF-ERK-Signals durch den EGFR bewirkt dieser auch die Aktivierung der PI3Kinase (PI3K). Die PI3K wird neben verschiedenen Adapterproteinen wie IRS1 auch von RAS aktiviert [16]. Dieser Prozess kann an unterschiedlichen Stellen inhibiert werden. Durch Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol-bis-phosphat (PtInsP₂) entsteht Phosphatidyl-Inositol-tris-phosphat (PtInsP₃), welches über Aktivierung der Phosphat-abhängigen Kinase als second messenger fungiert. Durch Lipidphosphatasen, wie zum Beispiel PTEN, kann PtInsP₃ wieder zu PtInsP₂ dephosphoryliert werden [12].

RAS-Proteine sind monomere G-Proteine. Das bedeutet, dass sie durch die Umsetzung von GTP zu GDP Kinasekaskaden weiterleiten. Aktivierte RAS-Proteine vermitteln über den PI3K-Signalweg eine Aktivierung von AKT, welches letztlich über mTORC-Komplexe proliferative Prozesse initiiert [19]. Auf der anderen Seite steht ein durch die EGFR-Adaptorproteine vermittelter Signalweg. Diese vermitteln eine Heterodimerisierung von SOS und RAS. Eine Kinasekaskade über RAF, MEK1/2 und ERK1/2 wird in Gang gesetzt, die über ELK1 im Zellkern den *Serum response factor*

(SRF) aktiviert. Dieser bindet an DNA-Promotor-Regionen, welche ebenfalls proliferative Effekte verstärken [16, 20]. Die Aktivierung ist in Abb. 2 abgebildet.

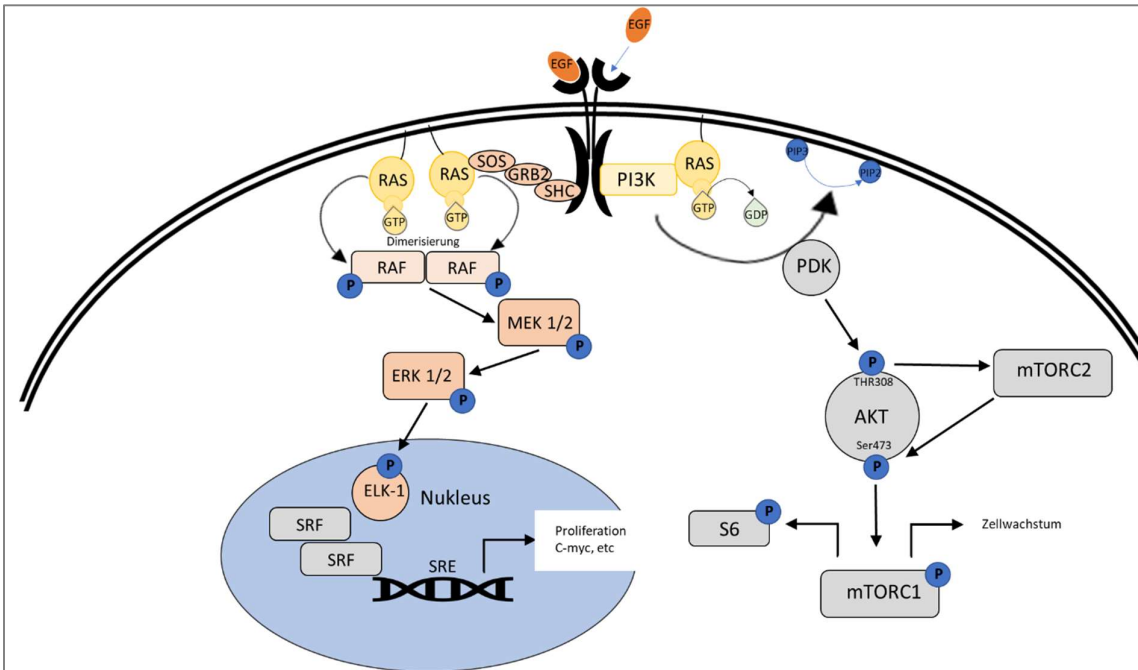


Abbildung 2: Der EGF-RAS-Signalweg

Durch eine extrazelluläre Aktivierung wird der EGF-Rezeptor aktiviert. Über eine duale Aktivierung von RAS wird einerseits über ERK1/2 die Zellproliferation über die Transkription angeregt. Andererseits wird das Zellwachstum durch die Aktivierung von mTORC-Komplexen gefördert. Der EGFR wird extrazellulär durch EGF stimuliert, dimerisiert, autophosphoryliert sich selbst und aktiviert über Adaptorproteine die RAS-Proteine [18]. Stromabwärts des EGFR gibt es zwei über RAS aktivierende Wege: Die RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 Signalkaskade und die Aktivierung der PI3K. In Letzterer wird mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) durch die Kinase AKT aktiviert. Die beiden Komplexe des mTOR, mTORC1 und mTORC2, haben grundlegende Bedeutungen in der Regulation von Wachstum und Differenzierung [21].

Die Aktivierung der beschriebenen Signalwege ist physiologisch durch die Bindung von EGF an den EGFR bedingt. Allerdings sind diese Signalwege auch Ursprung zahlreicher pathologischer Veränderungen, welche für die Karzinogenese diverser Tumoren verantwortlich sind.

Beispielsweise lassen sich in etwa 30% aller soliden Tumorerkrankungen Mutationen in der PI3K-AKT-mTOR-Achse finden [21].

In Bezug auf kolorektale Karzinome sollen vor allem der EGFR und RAS betrachtet werden.

Die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab [13] richten sich gegen den EGF-Rezeptor und blockieren seine extrazelluläre Domäne, sodass es bei KRK, welche einen RAS-Wildtyp aufweisen, zu keiner Aktivierung mehr kommt. Bei diesen Karzinomen kann durch die gehemmte Autophosphorylierung die Kaskade stromabwärts nicht weiter ablaufen. Obwohl dies theoretisch vielversprechend klingt und 85% aller KRK-Patienten einen positiven EGFR-Expressions-Status aufweisen, zeigen Therapien mit EGFR-gerichteten Antikörpern leider oft nicht die gewünschte Wirkung [13, 22]. Dies liegt meistens an Veränderungen der RAS-Gene, seltener an

PI3K-Mutationen [12] [16, 17]. EGFR-Antikörpertherapien dürfen daher nur *RAS* Wild-Typ Tumoren angewandt werden [23].

Es sind drei verschiedene *RAS*-Gene bekannt: *KRAS*, *HRAS* und *NRAS* [12, 16]. Dabei gibt es mit *KRAS4A* und *KRAS4B* zwei alternativ vorkommende Spleißvarianten. Ihre Schlüsselrolle in der Aktivierung der proliferativen Kaskaden machen sie zu Protoonkogenen. Kolorektale Karzinome gehen besonders häufig mit Mutationen im *KRAS*-Gen einher [12]. *KRASG12V/D* oder *13D* bezeichnen eine aktivierte Form des *KRAS* Proteins, welches die Proliferation des Kolonepithels stimuliert. Des Weiteren induziert mutiertes *KRAS* die Expansion von Tumorstammzellen und hemmt die Differenzierung in funktionelles Darmepithel. Mutationen im *KRAS* sind häufig bereits in Krebsvorstufen zu finden [17] und sind oft Folge einer Adenom-Karzinom-Sequenz.

Die onkogene Treibermutation liegt dabei häufig im Hydrolysezentrum von *KRAS*, wo die Bindung von GTP an *KRAS* stattfindet. Die Treibermutationen bewirken eine verringerte endogene GTPase-Aktivität von *KRAS*, wodurch GTP länger oder dauerhaft gebunden bleibt und *KRAS* durchgehend aktiv ist und dadurch die nachgeschaltete Signalkaskade stimuliert [13].

Durch die aufgehobene Regulierbarkeit wird die Karzinogenese vorangetrieben. Dabei zeigen unterschiedliche Mutationen verschiedene Prognosen auf: So ist die Transformation im *KRAS12D* mit einer besseren Prognose als im *KRAS12V* assoziiert. Durch das autonom agierende *KRAS* werden dessen nachgeschaltete Effektoren überaktiviert. Dies bedingt schließlich die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie *FOS*, *serum response factor* (SRF), *JUN* oder *NFκB*. Diese Faktoren initiieren eine verstärkte Expression von Cyclin G1 und Cyclin D1 [13]. Das Zusammenspiel von Cyclin D1 in Kombination mit onkogenen Veränderungen der *RAS*-Allele resultiert in einer unkontrollierten Zellzyklusprogression.

In der Regulation des Zellzyklus greift *RAS* auch in die Modulation der Apoptose ein. Abhängig von induzierten Signalwegen, kann es pro-apoptotisch und anti-apoptotisch wirken, wobei letztere Wirkung überwiegt [16].

Neben *KRAS*-Mutationen, kommen seltener auch Mutationen von *BRAF* und *PI3K* bei KRK vor. Sie haben eine ungünstige Prognose. Die Unabhängigkeit des *RAS*-Signalweges von EGF stellt in der Therapie des KRK eine große Herausforderung dar [12].

1.2.1 Metabolische Wirkung

RAS reguliert über *mTORC* die Aktivierung von *hypoxia inducible factor α* (HIFα), welcher dadurch nicht abgebaut wird und über Bindung an HIFβ u.a. für einen Einbau von Glukose-Transportern und der Aktivierung glykolytischer Enzyme sorgt und somit den sogenannten „*glykolytic shift*“ erzeugt [16]. Ebenfalls wird dadurch die Expression des *vascular endothelial growth factor a* (VEGFa) aktiviert. Die dadurch stärkere Gewichtung eines Wachstumsstoffwechsels fördert die Tumorprogression.

1.2.2 Immunologische Wirkung

Onkogenes RAS vermindert die Anzahl von MHC-Molekülen an der Oberfläche von Tumorzellen, die in der Immunantwort durch T-Zellen erkannt werden können. Eine Komponente stellt dabei die verminderte Expression und Funktionalität von verschiedenen Transportproteinen der Antigen-präsentierenden Peptide dar. Dies führt zu einer verringerten Immunogenität der Tumorzellen, was zur Folge hat, dass sie schlechter durch T-Zellen erkannt werden. Zudem ist bekannt, dass in humanen Tumoren mit RAS-Mutation die Immunantwort oft zu Gunsten des Tumors unterdrückt wird [16]. Beispielsweise zeigt sich in gastrointestinalen KRAS-mutierten Adenokarzinomen eine Anreicherung von immunosuppressiven Zellen und Zytokinen, in Kombination mit einer Verringerung der o.g. Anzahl von anti-Tumor-gerichteten T-Zellen eine Verringerung der Immunantwort bewirken [24].

1.2.3 Metastasierung

RAS-Mutationen sind bei metastasierten soliden Tumoren häufig. Für den Prozess der Metastasierung ist eine Veränderung der Zell-Zell-Adhäsionen verantwortlich. Onkogen verändertes RAS beeinflusst molekulare Mechanismen, die die Struktur der interzellulären Adhäsionsverbindungen verändert. Beispielsweise wird die Transkription von E-Cadherin durch Suppression verringert, auch werden Komplexe von E-Cadherin und β -Catenin destabilisiert. Die Expression von Integrin, welches mit der extrazellulären Matrix interagiert, wird ebenfalls reduziert. Außerdem zeigt sich in RAS-mutierten Tumoren eine erhöhte Zellbeweglichkeit, da die zytoskelettale Struktur so verändert wird, dass Zellmigration verstärkt abläuft. Tumorzellen, die RAS-Mutationen aufweisen, zeigen eine erhöhte Expression von Matrix-Metallo-Proteasen, was zu einer erschwerten Apoptose der Zellen führt und sie länger in intravasalen Räumen zirkulieren lässt und die hämatogene oder lymphogene Metastasierung wahrscheinlicher werden lässt [16].

1.3 Der PI3-Kinase-Signalweg

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) nehmen in dem EGFR-RAS- und auch in anderen Signalwegen eine wichtige Rolle ein. Daher werden sie genauer beschrieben. Das Grundgerüst von Phosphatidylinositol (PtlNs) ist ein sechswertiger, zyklischer Alkohol, der auch als myo-Inositol bezeichnet wird. Er ist über eine Phosphoesterbindung an einen Glycerinkörper gekoppelt, der neben dieser polaren Phosphatgruppe auch zwei apolare Fettsäureester besitzt. Die apolaren Fettsäurereste vermitteln die Integration an der Innenseite der Zellmembran. Die freien Hydroxylgruppen des sechswertigen, zyklischen Alkohols können phosphoryliert werden. Diese Eigenschaft macht PtlNs zu einem geeigneten Botenstoff in verschiedenen Kompartimenten von Zellen. Neben Funktionen im Vesikeltransport und der Organisation des Zytoskeletts, stellen sie auch in der Vermittlung von Signalkaskaden eine wichtige Komponente dar. Werden transmembranöse Rezeptoren extrazellulär aktiviert, wird PtlNs als sogenannter *second messenger* genutzt. PI3K vermitteln diesen Prozess. Es gibt drei Klassen von PI3K: Klasse 1 synthetisiert PtlNs(3,4,5)-Phosphat und PtlNs(3,4)-Phosphat durch die Phosphorylierung ihrer Substrate an der 3-Stelle des Inositorings. Klasse 2 synthetisiert PtlNs(3)P und zum Teil auch PtlNs(3,4)P, Klasse 3 synthetisiert PtlNs(3)P [25].

Für die Betrachtung von KRK ist die PI3K Klasse 1 am wichtigsten [26, 27]. PI3K besitzen katalytische und regulatorische Untereinheiten. Die regulatorische Untereinheit der PI3K Klasse 1a ist p85. Dieses Protein bindet die katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ , Produkte der Gene *PI3KCA*, *PI3KCB* und *PI3KCD*. Eine Aktivierung der PI3K wird durch die extrazelluläre Ligandenbindung an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) vermittelt. Durch eine Autophosphorylierung kann die regulatorische Untereinheit p85 an den intrazellulären Anteil der RTK binden [28]. Dadurch können Adaptorproteine wie SHC und GRB2 an die RTK binden (siehe Abb.2). Über die Bindung von SOS wird letztlich RAS aktiviert. RAS aktiviert die katalytischen Untereinheiten von p85. Eine Aktivierung der katalytischen, p85-unabhängigen Untereinheit p110 γ kann genauso stattfinden, wie die p85-abhängige Aktivierung der Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ . Eine Mutation der *PI3KCA* in der Untereinheit p110 α findet sich in einigen KRK [29]. Die ebenfalls verwendete Zelllinie HCT116 besitzt eine solche Mutation [30]. Durch die Aktivierung der PI3K wird PtdIns(3,4,5)P₃ und PtdIns(3,4)P₂ synthetisiert (s.o.). Daraus resultiert eine Aktivierung der PDK1 und schließlich AKT, was nach einer positiven Rückkopplung mit mTORC2 proliferative Prozesse fördert.

1.4 Das Serum *Response Element*

Das *serum response element* (SRE) ist eine DNA-Region, an der das oben bereits erwähnte Protein *serum response factor* (SRF) bindet. Die Förderung der Transkription aktiviert u.a. *c-FOS*, welches proliferativ und anti-apoptotisch wirkt. Die Aktivierung von SRF wird über die Kinasekaskade, die unterhalb der RAS-ERK-Kaskade liegt, vermittelt. Bei Mutationen des Proto-Onkogens *RAS*, wird auch SRF stärker aktiviert. Das nukleäre Protein ELK-1 wird an seinem C-Terminus durch ERK1/2 phosphoryliert und bindet SRF über seine B-Domäne [31]. Diese Komplexbildung ermöglicht die Bindung an das SRE und aktiviert die Transkription eines die Proliferation fördernden Gen-Profiles.

1.5 Der WNT- β -Catenin-Signalweg

Neben dem RAS-Signalweg gehören Mutationen, die im WNT- β -Catenin-Signalweg vorkommen, zu den Hauptmechanismen in der Entstehung von KRK [14]. Daher soll dieser Signalweg genauer betrachtet werden.

WNTs sind eine Familie von extrazellulären Signalproteinen, welche als Liganden für den zugehörigen WNT-Signalweg fungieren. Der Name WNT ist ein Fachterminus, welcher sich aus einem Protein der Drosophila (*Wg*, *wingless*) und *INT1* zusammensetzt. Es sind bislang 19 humane Gene bekannt, die WNT-Faktoren kodieren. Dabei aktivieren verschiedene WNT-Proteine unterschiedliche Signalkaskaden.

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen einer β -Catenin-abhängigen und -unabhängigen Signaltransduktion [32]. Somit kann man die durch WNT vermittelte Signaltransduktion in eine kanonische (β -Catenin-abhängige) und nicht-kanonische (β -Catenin-unabhängige) Form unterteilen.

1.5.1 β -Catenin-abhängiger WNT-Signalweg

Die WNT-Proteine WNT1, WNT3a und WNT8 aktivieren hauptsächlich den β -Catenin-abhängigen WNT-Signalweg. Dieser ist am besten untersucht.

In der unstimulierten Zelle bindet an β -Catenin, welches sich im Zytoplasma befindet, ein Degradationskomplex, der dessen proteasomalen Abbau bedingt. Zu diesem Komplex gehören die Caseinkinase 1 α (CK1 α), die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β), APC (*adenomatous polyposis coli*), sowie Axin. β -Catenin wird durch die CK1 α am Ser45-Rest phosphoryliert. Weiterhin finden Phosphorylierungen an den Thr41, Ser37 und Ser33-Resten durch die GSK3 β statt. Das β -TrCP E3-Linker Protein wird rekrutiert, β -Catenin wird poly-ubiquitinyliert und letztlich proteasomal abgebaut. Der Abbau kann dadurch verhindert werden, dass sekretorische WNT-Liganden an den membranständigen *Frizzled*-Rezeptor (FZD) binden. LRP5 oder LRP6 (*lipoprotein receptor-related protein*) dienen dabei als Co-Aktivatoren. Dies phosphoryliert und aktiviert das zytosolische *dishevelled* Protein (DVL). DVL bindet an den intrazellulären Anteil des FZD-Rezeptors. Durch die Sequestration der GSK3 β kann die Bindung zu CK1 α nicht eingegangen werden und der Zerstörungskomplex wird aufgelöst, sodass das zytosolische β -Catenin nicht mehr abgebaut wird und sich folglich anreichert. Es wird in den Kern transloziert und bildet einen Komplex mit TCF (T-Zell Transkriptionsfaktor) und LEF (*lymphoid enhancer factor*). Dies führt zu einer Expression von Zielgenen, die unter anderem wichtige Funktionen in der Proliferation und Transformation einnehmen [32].

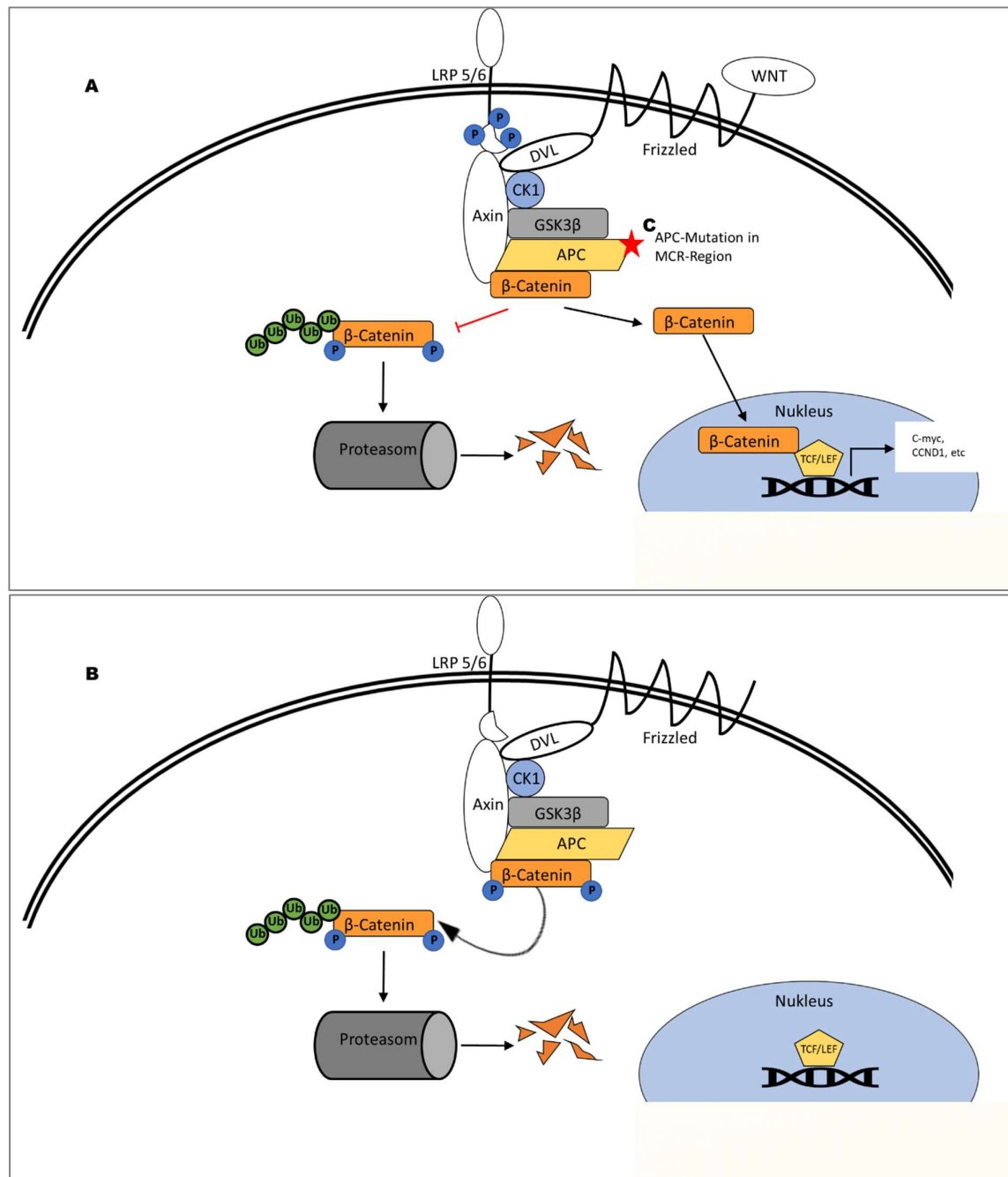


Abbildung 3: Der β -Catenin-abhängige (kanonische) WNT-Signalweg

A: WNT- β -Signalweg: In der Abwesenheit eines extrazellulären WNT-Liganden bindet β -Catenin an den β -Catenin-Zerstörungskomplex. GSK3 β und CK1 phosphorylieren β -Catenin, welches wiederum über weitere Zielenzyme ubiquitinyliert und schließlich proteasomal abgebaut wird.

B: Gibt es ein extrazelluläres WNT-Signal, so induzieren CK1 α und GSK3 β die Phosphorylierung von LRP5/6. Dies bewirkt die Rekrutierung von DVL. Dessen Bindung an Axin bewirkt die Dissoziation des Zerstörungskomplexes. Unphosphoryliertes β -Catenin entgeht der proteasomalen Degradierung und aktiviert proliferative Zielgene wie *c-MYC*, *CCND1* und andere.

C: Durch die im KRK häufig beschriebenen APC-Mutationen in der MCR-Region kommt es zu einem unfunktionellen Zerstörungsprozess, was einen verminderten Abbau von β -Catenin zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung seiner Zielgene [33].

1.5.2 β -Catenin-unabhängige Signalwege

Als β -Catenin-unabhängige WNT-Signalwege werden diejenigen Signalwege bezeichnet, die nicht über β -Catenin LEF oder TCF aktivieren. Die WNT-Proteine WNT5a und WNT11 aktivieren hauptsächlich diese Signalwege. Ein gut beschriebener Signalweg ist der PCP-Signalweg, der eine Kaskade von GTPasen aktiviert. Er ist zum Beispiel für die Zellpolarität von Bedeutung, besonders während Phasen der Fetalzeit. Der PCP-abhängige Signalweg hemmt den β -Catenin-abhängigen Signalweg. Es sind weitere β -Catenin-unabhängige Signalwege beschrieben, zum Beispiel der Calcium-abhängige Signalweg. Für die Entwicklung des KRK spielt jedoch der β -Catenin-abhängige WNT-Signalweg eine zentrale Rolle [32].

1.6 APC-Mutationen

1.6.1 Veränderter WNT-Signalweg im KRK

80-90% aller KRK-Patienten weisen eine Mutation im *APC*-Gen auf [34, 35]. Das APC Protein ist ein zentraler Bestandteil des β -Catenin-Zerstörungskomplexes, welcher die WNT-Aktivität durch β -Catenin-Abbau hemmt. Durch Mutationen bindet APC schlechter an β -Catenin. Auch die Aktivierung Axins durch Phosphorylierung ist von dem Tumorsuppressor APC abhängig [36]. Durch die Veränderungen des Zerstörungskomplexes wird β -Catenin auch ohne eine vorherige Aktivierung durch WNT-Liganden angereichert, gelangt in den Kern und aktiviert dort Proliferationszielgene. Die Tumorgenese wird dadurch gefördert.

Es sind auch Axin1- und β -Catenin-Mutationen bekannt, die mit einer Hyperaktivierung des Signalwegs einhergehen, diese sind aber deutlich seltener [34].

Im Rahmen der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz treten bereits in frühen Tumorstufen Mutationen im *APC*-Gen auf, welche die Pathogenese vorantreiben [37]. Ausgenommen sind jedoch Tumore mit vielen CpG-Inseln (CIMP) und MSI-H-Tumore mit Defekten im Mismatch-Repair-System. Keimbahnmutationen treten bei über 90% der Patienten mit klassischer familiärer adenomatöser polyposis coli (FAP) auf. Genauso, wie in sporadischen Formen des KRK entsteht auch bei der FAP die Tumorerkrankung durch Mutationen beider Allele [38].

1.6.2 Struktur des APC Proteins

Das *APC*-Gen liegt auf dem Chromosom 5q21-22 und beinhaltet 15 kodierende und 3 nicht-kodierende Exons. Das Protein besteht aus 2843 Aminosäuren. Das APC-Protein wird in vielen Geweben exprimiert und nimmt dort verschiedene Funktionen ein. Im Kolon sind APC-Proteine in den Krypten und der luminalen Oberfläche lokalisiert. Verglichen mit seiner Isoform APC2 bindet APC stärker an β -Catenin, was mit einer Sequenz von 15 unterschiedlichen Aminosäuren zusammenhängt [34]. Dadurch inhibiert APC2 den WNT-Signalweg weniger stark.

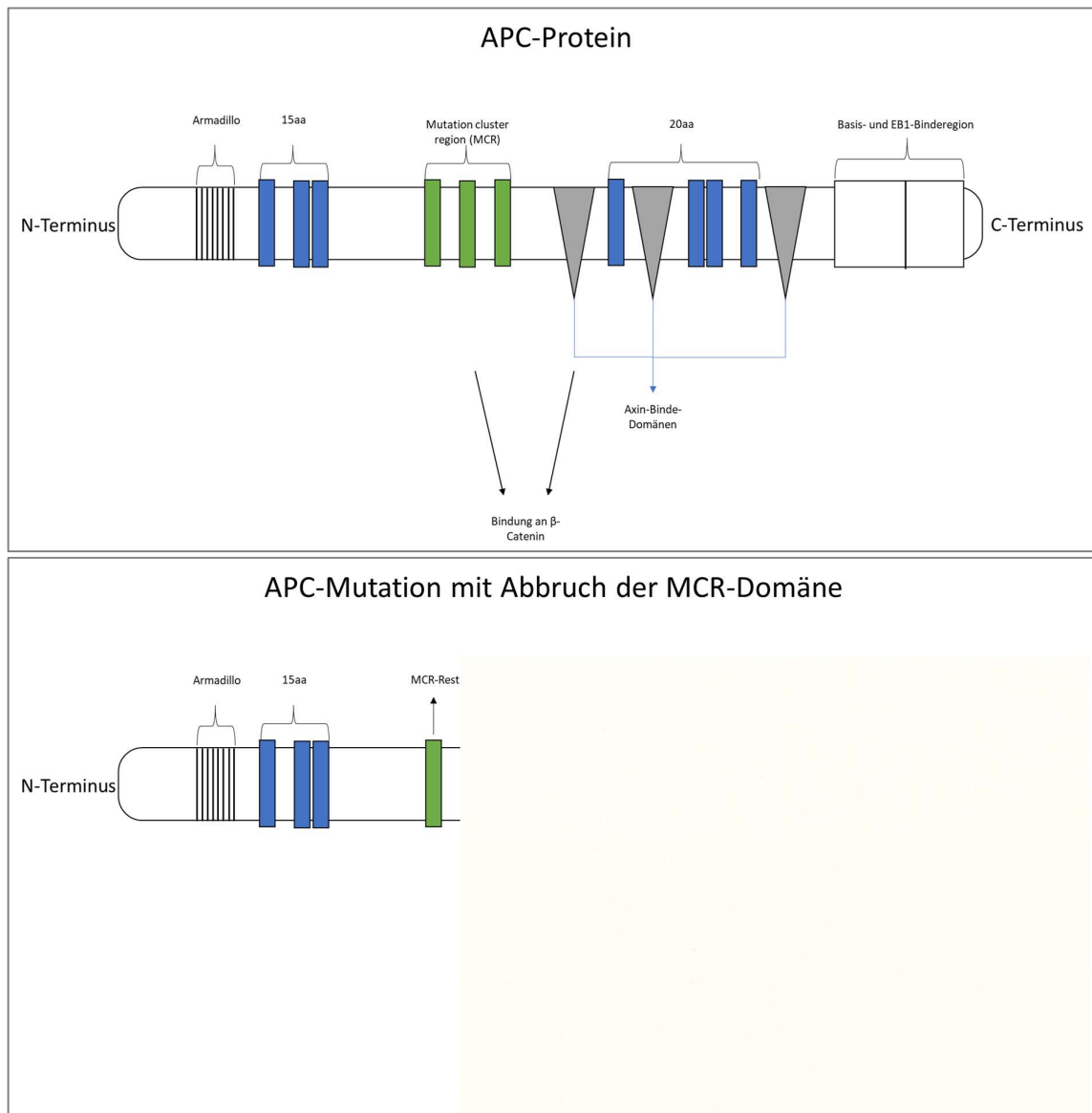


Abbildung 4: Das APC-Protein und APC-Mutationen

Häufig führen Mutationen in der Mutation Cluster Region des *APC*-Gens zu einem Abbruch der Translation, sodass ein unfunktionelles Protein entsteht [35].

1.6.3 APC und der WNT- β -Catenin-Signalweg

Die Interaktion von APC und dem WNT-Signalweg basiert auf der Funktion der β -Catenin-inhibitorischen Domäne (CID). Diese befindet sich an der *Mutation Cluster Region* (MCR), zwischen der zweiten und dritten *20aa-repeat*-Domäne. Durch Mutationen in der MCR kommt es zu einem Verlust der C-terminalen Domäne [35]. Eine unkontrollierte Überaktivierung von β -Catenin ist die Folge. Dies hat wiederum die Überaktivierung verschiedener proliferativer Mechanismen zur Folge. In rund 80-85% der Fälle sind oben erwähnte Mutationen mit einem Verlust der C-terminalen APC-Sequenz eine frühe, möglicherweise initiale Veränderung in der Pathogenese sporadischer kolorektaler Karzinome [39].

1.6.4 Die Rolle von APC-Mutationen in zielgerichteten Therapien

Analog zu *KRAS*-Mutationen werden *APC*-Mutationen teilweise ebenfalls als sogenannte Treibermutation in der kolorektalen Karzinogenese beschrieben [35]. Dafür spricht z.B., dass Patienten mit sehr hohem *APC*-Mutationsstatus ein kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen, was wiederum auf die Abhängigkeit der Karzinogenese vom *APC*-Status hinweist [40]. Andererseits gibt es Ergebnisse, die darstellen, dass Tumorpatienten ohne *APC*-Mutation eine schlechtere Prognose zeigen als Patienten mit einer einzigen Mutation.

Die Sensitivität von Tumoren mit positivem *APC*-Mutationsstatus auf konventionelle Chemotherapeutika könnte herabgesetzt sein. Gezeigt werden konnte dies am Beispiel der Alkylanzien wie Methylmethansulfonat. Die DNA-Schäden können bei verstärkter *APC*-Aktivierung reduziert werden, weil es zu einer Disinhibition von DNA-Reparatursystemen kommt, woraus ein Wirkverlust der Alkylanz resultiert. Auf der anderen Seite ist der *APC*-Wildtyp mit einem guten Ansprechen auf Alkylanzien assoziiert, da in diesem Fall über die Hemmung von DNA-Polymerasen wie Pol- β und dem *Single-Nucleotide*-Reparatursystem wie SN-BER die Reparatur zerstörter DNA durch Wildtyp-*APC* unterbunden wird [34].

1.6.4.1 HDACs

Histondeacetylasen (HDACs) steuern durch die Deacetylierung von Histonen die Expression von Genen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass HDAC-Inhibitoren in der Tumorthherapie verwendet werden könnten, da sie Apoptosemechanismen aktivieren. Kolorektale Karzinomzellen, in denen *APC* mutiert ist, sprechen schlechter auf HDAC-Inhibitoren an, da diese Zellen die Expression des „Überlebens-Proteins“ Survivin hemmen, ein Protein, welches in nicht *APC*-mutierten Krebszellen ein Angriffspunkt für HDACs darstellt. Eine Apoptoseinduktion durch HDACs scheint also bei kolorektalen, *APC*-mutierten Karzinomen nicht möglich [41].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die für KRK typischen *APC*-Mutationen proliferative und oft karzinogene Veränderungen verstärken. Dies macht das *APC*-Gen zu einem potenziellen Biomarker aber auch zu einem spezifischen Therapieziel in der Therapie des kolorektalen Karzinoms. *APC*-mutierte Tumore sind aktuell nur durch klassische Chemotherapeutika medikamentös behandelbar. Da es aktuell keine zielgerichteten Therapeutika gibt, erscheint eine genauere Erforschung und Therapie dieser Mutation sinnvoll und notwendig.

1.6.5 Bezug des WNT- β -Catenin- und EGFR-RAS-Signalweges in KRK

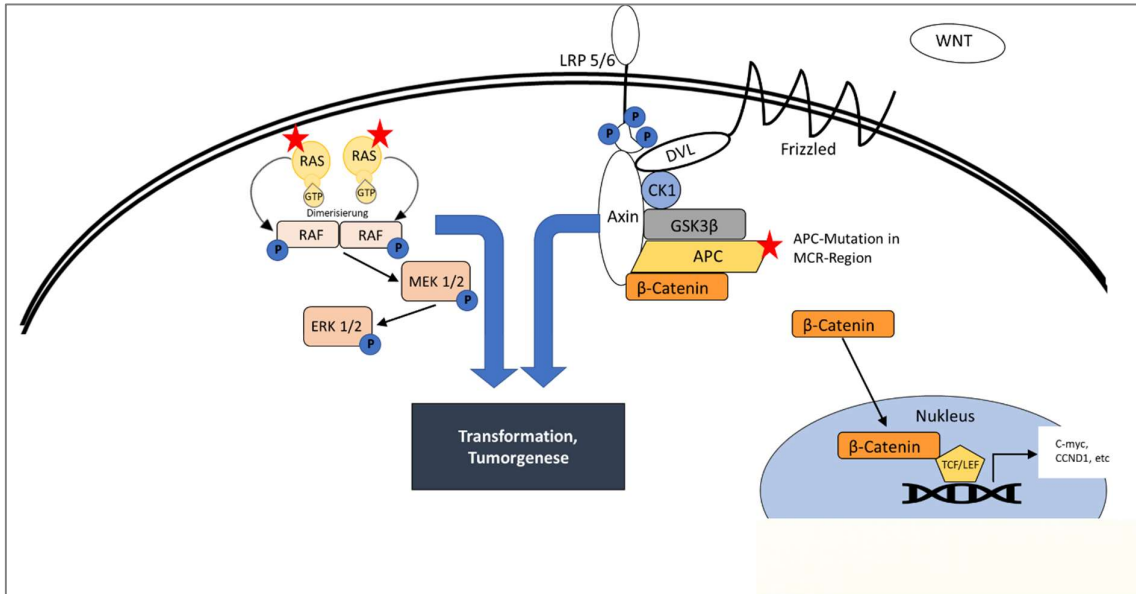


Abbildung 5: Verbindungen von WNT- und RAS-Signalweg

Der WNT- β -Signalweg und die RAS-Signalkaskade stehen in einem engen Zusammenhang bezüglich ihrer gegenseitigen Koaktivierung. Mutationen im APC- und KRAS-Gen führen zu einem Fortschreiten der kolorektalen Karzinogenese [42, 43].

KRAS- und APC-Mutationen zählen als Treiber in Pathogenese des KRK. Die beiden Signalwege sind nicht strikt getrennt voneinander zu betrachten. Dies zeigt sich daran, dass sich der RAS-RAF-MEK-Signalweg zusätzlich durch WNT3a stimulieren lässt [42]. Es kann also ein Zusammenhang zwischen dem β -Catenin-abhängigen WNT-Signalweg und der durch EGF induzierten RAS-Kaskade festgestellt werden. Die RAS-Isoform HRAS wird durch die GSK3 β bei ausbleibendem Signal durch WNT-Proteine an Thr-144 und Thr-148 Resten phosphoryliert und folgend durch β -Transducin vielfach ubiquitinyliert und schließlich proteasomal abgebaut. Dadurch wird die Aktivität der RAS-abhängigen Signalkaskade reduziert und die Transformation gehemmt. Die Thr-144- und Thr-148-Reste sind in den bekannten RAS-Isoformen NRAS und dem für das KRK relevante KRAS ebenfalls enthalten, was den Einfluss der GSK3 β auf den Abbau von KRAS nahelegt. Unter WNT-Stimulation dissoziiert der β -Catenin-Zerstörungskomplex. In Analogie zum β -Catenin werden RAS-Proteine durch die sich im Komplex befindende GSK3 β auch nicht mehr abgebaut, sodass die stromabwärts gerichtete Kaskade über RAF-MEK1/2-ERK1/2 weiter ablaufen kann [43].

Treten KRAS- und APC-Mutationen gemeinsam auf, so entstehen aggressive, rasch progrediente Tumore [42, 43]. Einzeln auftretende APC- oder KRAS-Mutationen bringen diese Eigenschaften nicht mit sich. In Mausmodellen konnte festgestellt werden, dass die Kombination von Mutationen in beiden Genen zu einem signifikanten Anstieg von den Kolonstammzell-Markern CD44, CD133, und CD166 führt [42, 43].

Des Weiteren entwickelten die Mäuse Lebermetastasen, die *APC*- und *KRAS*-Mutationen aufwiesen, im Gegensatz zu denen, die z.B. nur die *KRAS*-Mutation aufwiesen. Erst durch die zusätzlich auftretende *APC*-Mutation wurde also die Stammzellproliferation eingeleitet [42, 43].

1.6.6 WNT-Aktivierung durch MEK1/2-Inhibitoren

Durch den Einsatz von MEK1/2-Inhibitoren findet eine Hemmung unterhalb des KRAS-Proteins statt. Gleichzeitig kommt es zu einer Hemmung von Axin1 und GSK3 β , woraus eine Dissoziation des β -Catenin-Zerstörungsprozesses folgt und somit die vermehrte Aktivierung des WNT-Signalweges [44]. Wird die RAS-abhängige Signalkaskade also gehemmt, kommt es über diesen Rückkopplungsmechanismus zu einer vermehrten Dissoziation des β -Catenin-Zerstörungskomplexes. Dies führt nicht nur zur Hemmung der Degradierung von β -Catenin, sondern könnte mutmaßlich als positive Rückkopplung auch eine verringert stattfindende Phosphorylierung von RAS bedingen.

1.7 Peroxisomen-Proliferator-Aktivierende Rezeptoren

Peroxisomen-Proliferator-aktivierende Rezeptoren (PPARs) sind Kernrezeptoren, die im Glukose- und Lipidstoffwechsel komplexe modulierende Funktionen übernehmen. Es sind bislang 3 verschiedene Formen von PPARs bekannt: PPAR α , PPAR β und PPAR γ , die von verschiedenen Genen kodiert werden. Strukturell gehören sie zu einer Familie, funktionell unterscheiden sie sich dennoch stark.

PPAR α wird v.a. in Geweben exprimiert, in denen der Stoffwechsel von Fettsäuren einen hohen Stellenwert einnimmt. Dort vermittelt PPAR α die Aufnahme oxidierter Fettsäuren in die Zellen. Zu den synthetischen Liganden von PPAR α zählen Fibrate, welche durch dessen Aktivierung pharmakologisch zu einem Absinken von erhöhten Triglyzeridspiegeln führen. Ebenso sind jedoch ihre renalen Nebenwirkungen hervorzuheben: Sie erhöhen u.a. die den Kreatinin-Spiegel und haben in dieser Therapieindikation keinen hohen Stellenwert mehr. PPAR β spielt eine Rolle im Lipid- und Cholesterin-Metabolismus. Er wird nahezu ubiquitär exprimiert. PPAR γ 1 und PPAR γ 2 kommen vor allem in weißem und braunem Fettgewebe vor [45].

Hohe extrazelluläre Spiegel von Triglyzeriden und Cholesterinen verstärken Entzündungsreaktionen. Langfristig bestehende Entzündungen können zu molekularen Veränderungen führen und letztlich eine Entartung von Geweben bewirken [46]. Aufgrund ihrer Rolle im Metabolismus von Fetten nehmen PPARs Funktionen in der Proliferation und Differenzierung von Zellen ein. Diese Funktionen machen sie zu einem zentralen Element in der Tumorgenese. Besonders der PPAR γ ist hierbei von Bedeutung [47].

1.7.1 Struktur von PPAR γ

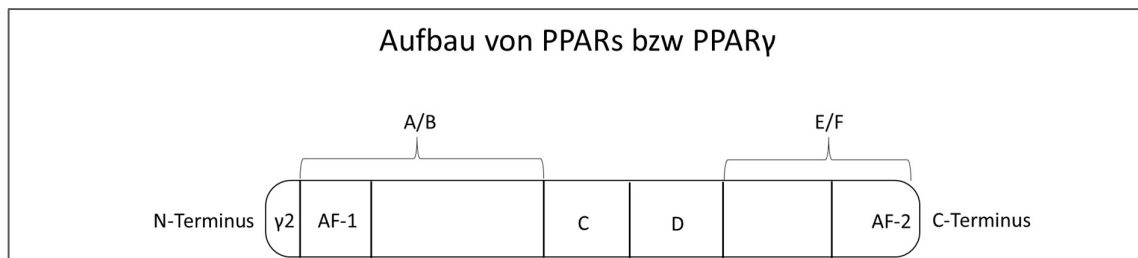


Abbildung 6: Aufbau von PPAR γ [48]

A/B: Hypervariable Region, dort enthalten ist die AF-1-Domäne, die für die transaktivierende Funktion des Kernrezeptors wichtig ist. Unabhängig vom Liganden wird der Kernrezeptor hier durch ERK1/2 inhibitorisch phosphoryliert. Am N-Terminus von PPAR $\gamma 2$ ist eine 30 Aminosäure längere Sequenz aufgrund der alternativen Spleißvarianten.

C: In der C-Region befindet sich die DNA-Bindungsdomäne für das PPRE.

D: In der D-Domäne befinden sich allosterische Aktivierungs- und Repressorstellen, die regulatorische Funktionen einnehmen. Während der Ligandenbindung kann es hier zu Konformationsänderungen kommen.

E/F: In der E/F-Region befindet sich die Ligandenbindungsstelle. Am C-Terminus bindet die AF-2-Domäne an den Korezeptor RXR, sofern PPAR γ aktiviert wird [48].

PPARs sind heterodimere Rezeptoren, die in Kombination mit Retinoid-Rezeptoren (RXR) die Transkription von Genen induzieren. Dafür binden sie an sogenannte *PPAR-response elements* (PPRE) in Enhancern oder Promotorregionen. Diese DNA-Bindemotive befinden sich meist in der 5'-regulatorischen Region des Zielgens. PPAR und RXR binden an das *response element* über DR1 (*direct repeat*) Zielsequenzen. Die 5'-flankierenden DNA Basen sind dabei für die spezifische Bindungsmöglichkeit verschiedener PPAR-Isotypen verantwortlich [45].

1.7.2 PPAR γ

Die Funktionen des PPAR γ bestehen in der Regulation von Glucose-Homöostase und Lipidspeicherung. Daher kommt er vor allem in weißem und braunem Fettgewebe vor, aber auch in Epithelzellen, wie zum Beispiel der Darmschleimhaut. Das *PPARG* Gen besitzt verschiedene Promotoren und Exons, deshalb entstehen drei verschiedene mRNAs: PPAR $\gamma 1$, PPAR $\gamma 2$ und PPAR $\gamma 3$. Die von den mRNAs translatierten Proteine sind identisch für PPAR $\gamma 1$ und PPAR $\gamma 3$. Die Isoform von PPAR $\gamma 2$ enthält am N-Terminus zusätzliche 30 Aminosäuren. PPAR $\gamma 2$ wird nur im Fettgewebe exprimiert, ist aber auch ein stärkerer Transkriptionsaktivator [49, 50].

1.7.3 Antiproliferative Wirkungen von PPAR γ

PPAR γ reguliert Gene, die an dem Austausch und Transport von Fettsäuren teilnehmen, wie Lipoproteinlipase (LPL) und den Fettsäuretransporter CD36. In Gefäßendothelien wirkt er modulierend auf Entzündungsprozesse. Sein inhibierender Einfluss in der Karzinogenese wurde zunehmend erforscht. Antiproliferative Wirkungen des PPAR γ sind die Reduktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF α und IL6. Im Fettgewebe kommt es zu einer Verschiebung von zytotoxischen M1 zu M2 polarisierten Makrophagen. Durch die Hemmung von AP1 und ETS Transkriptionsfaktoren wird die Promotorregion von Cyclin D1 nicht aktiviert [45].

Cyclin D1 bewirkt den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase. Im KRK vorkommende *KRAS*-Mutationen bewirken einen Anstieg von Cyclin D1. Hier wirkt PPAR γ entgegen, indem er die Phosphorylierung von AKT inhibiert [51]. Auch apoptotische Mechanismen werden durch die Aktivierung der pro-apoptotischen Gene *BAD* und *BAX* eingeleitet.

1.7.3.1 Struktur von PPAR γ

Wie alle PPARs besteht PPAR γ aus 6 Regionen. Am N-Terminus befinden sich die hypervariablen A- und B-Regionen. Die DNA-Bindungsstelle befindet sich auf der C-Region. Die D-Region besitzt regulatorische Funktionen und kann bei Dimerisierung von PPAR γ mit RXR Konformationsänderungen bewirken. Von besonderer Bedeutung sind die AF-Domänen: An der AF-1-Domäne kann durch posttranslationale Veränderung eine Regulation stattfinden und an der AF-2-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für den RXR. Diese Bindung erfolgt in der E/F-Region [48].

1.7.3.2 Posttranslationale Modifikation

Wird humanes PPAR γ 1 am Ser84-Rest, bzw. PPAR γ 2 am Ser114-Rest der AF1-Domäne phosphoryliert, so vermindert dies die Aktivität des Kernrezeptors. Proteinkinase C, die Mitogen-aktivierenden Kinasen (MAPK) sowie deren Mitglieder, die Extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 können PPAR γ an dieser Stelle phosphorylieren und dessen Funktion dadurch hemmen. Diese Mechanismen beschreiben den Einfluss von PPAR γ auf den RAS-Signalweg [48]. Wie bereits erwähnt, bewirken die im KRK häufig vorkommenden *KRAS*-Mutationen eine unkontrollierte Überaktivierung des nachgeschalteten Signalwegs. Dies bedingt auch eine stärkere ERK1/2-Aktivierung, was schließlich in einer Hemmung von PPAR γ resultiert.

1.7.3.3 Änderung der subzellulären Lokalisation

Die genomische Aktivität von PPAR γ wird nicht nur durch eine posttranslationale Modifikation abgeschwächt oder aktiviert, sondern auch durch die Veränderung des zellulären Kompartiments. Durch eine Translokation vom Kern ins Zytosol nimmt die PPAR γ -Aktivität ab. In Folge einer Aktivierung RAS-abhängiger Signalkaskaden führt die Aktivierung von MEK1 zur Bildung eines MEK1-PPAR γ -Komplexes und zu dessen Export aus dem Kern in das zytosolische Kompartiment [52]. In vielen soliden Tumoren ist dies ein Effekt, welcher die Tumorprogression weiter vorantreibt.

1.7.4 Glitazone

Vor etwa 20 Jahren wurden PPAR γ -Agonisten für die Diabetestherapie entwickelt. Sogenannte Glitazone, wie zum Beispiel Rosiglitazone sind pharmakologische Liganden von PPAR γ . Sie induzieren eine Adipozytenreifung [53, 54]. Durch die Translokation von GLUT4 in Adipozyten verbessern sie die periphere Insulinsensitivität. Zudem verringern sie die Spiegel von freien Fettsäuren und verstärken die Adipozytenreifung [49]. Aufgrund von Nebenwirkungen, vor allem der Entwicklung von Ödemen, werden sie heutzutage jedoch kaum noch eingesetzt. Durch das Abschwächen systemischer Entzündungsvorgänge könnten sie in der Therapie vom KRK dennoch eine interessante Rolle spielen. So induzieren sie die Expression

des CDK-Inhibitors P21 CIP1/WAF1. Dadurch wird die Zellproliferation durch die RAS-ERK1/2-Signalkaskade stärker gehemmt. In der KRK-Zelllinie HCT15 verhindert dies Wachstum und Zellzyklusprogression [55].

1.7.5 PPAR γ und WNT

In der Betrachtung der Interaktion von PPAR γ mit dem WNT-Signalweg lassen sich Gemeinsamkeiten zwischen dem stoffwechselbedingten Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) und dem KRK hervorheben. Beide Erkrankungen gehen mit einer verringerten genomischen PPAR γ -Aktivität und einem vermehrten Ablauf des WNT- β -Catenin-Signalwegs einher [56]. Daraus resultiert eine gesteigerte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) [56]. Diese hemmt den Pyruvatdehydrogenase-Komplex durch Phosphorylierung. Dadurch kann eine aerobe Glykolyse nicht weiter stattfinden. Dieses Phänomen wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet [49]. PPAR γ hemmt die Translation der PDK-mRNA und fördert somit die vollständige Aufspaltung in Acetyl-CoA im mitochondrialen Citratzyklus. Dies ist ein dem WNT-Signalweg opponierender Effekt.

Des Weiteren bewirken PPAR γ -Agonisten eine Verringerung des zytoplasmatischen Anteils an β -Catenin in verschiedenen Zellen [56]. PPAR γ kann dabei über die Aktivierung von APC den proteasomalen Abbau zytoplasmatischen β -Catenins bewirken. Andererseits bindet β -Catenin an eine Catenin-Binde-Domäne von PPAR γ . Dadurch könnte eine weitere, nicht-genomische Hemmung möglich sein [56, 57]. Gegensätzlich dazu hemmt ein überaktivierter WNT-Signalweg die PPAR γ -Aktivität [56].

1.8 Die PD-L1-Expression als Ausdruck der Immunevasion von Tumoren

Liganden-assoziierte Kaskaden werden häufig auch von Immunantworten beeinflusst. Da in Tumoren Entzündungsreaktionen Teil der Prozesse sind, kann es zu einer Immunzellinfiltration kommen. Das Entkommen einer Immunantwort ist Bestandteil von karzinogen veränderten Geweben [58].

T-Zellen sind die Effektorzellen der erworbenen Immunität. Sie erkennen Peptidstrukturen als Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei werden die als Antigene erkannten Peptide über den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) präsentiert und von T-Zell-Rezeptoren erkannt. Das Auslösen einer Immunreaktion benötigt jedoch noch zusätzliche Kofaktoren, die diese Reaktion entweder fördern oder hemmen können. Sogenannte Immun-„Checkpoints“ sind Oberflächenproteine, die hierbei hemmend wirken. Der *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1) ist ein Checkpoint, der auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird. Er geht Bindungen mit dem PD-1-Rezeptor ein. Der PD-1-Rezeptor wird auf T-Zellen, B-Zellen und auch auf myeloischen Zellen exprimiert. Durch die Bindung an PD-L1 wird in Monozyten die Interleukin-10 (IL-10) Produktion angeregt, wogegen IL-2 und damit auch die Ausdifferenzierung potenter lymphatischer Abwehrzellen gehemmt wird. Hiermit wird eine Immunzellinfiltration verhindert [59, 60].

Tumore, die verstärkt PD-L1 exprimieren, entgehen eher einer Immunantwort und sind aggressiver als Tumoren, die dies nicht tun [60, 61]. In der Tumorthherapie wurden jedoch Checkpoint-Inhibitoren entwickelt, welche genau diese Tumore attackieren und wodurch sich dadurch Tumore, welche PD-L1-positiv sind, zusätzlich therapieren lassen. Checkpoint-Inhibitoren mit den Zielstrukturen PD-L1 und PD-1 sind in der Tumorthherapie klinisch etabliert. Wichtige Vertreter der Gruppe sind Atezolizumab und

Pembrolizumab [60]. Für mikrosatelliteninstabile (MSI) gastrointestinaler Tumoren zeigte die Checkpointblockade von PD-1 klinische Erfolge [62].

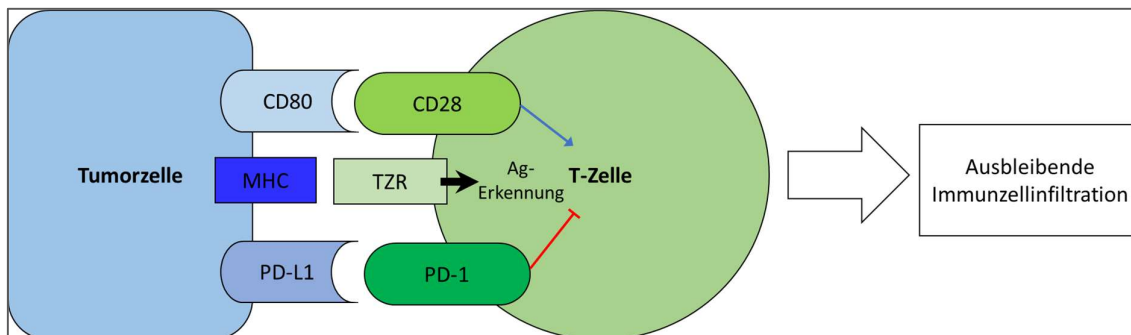


Abbildung 7: Funktion von PD-L1

MHC-Rezeptoren befinden sich auf jeder Zelle und präsentieren Antigene, die über den T-Zell-Rezeptor erkannt werden. In dem auf der Abbildung speziell gezeigten Fall ist die Antigen-präsentierende Zelle eine Tumorzelle. Koaktivierende Signale gehen über die Verbindung von CD80 und CD28 aus. PD-L1 vermittelt über PD-1 ein inhibitorisches Signal. Tumoren mit einem hohen PD-L1 Rezeptorstatus entkommen so der durch die T-Zellen physiologischerweise vermittelten Immunreaktionen [60].

MHC: Major Histocompatibility Complex, TZR: T-Zell-Rezeptor, Ag: Antigen, CD: Cluster of Differentiation, PD-L1: Programmed Death Ligand 1, PD-1 Programmed Death Cell Protein 1

1.8.1 Regulation

Es handelt sich bei PD-L1 um ein Typ1 Transmembranprotein mit einer extrazellulären Immunoglobulinstruktur mit variabler distaler Region und proximaler Fc-Region. Am stärksten unterscheidet sich die kurze intrazelluläre Domäne des Proteins von den verwandten B7-Molekülen. Die Überexpression von PD-L1 in Tumorzellen wird durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über Zytokine vermittelt. Interferon γ (IFN γ) aktiviert die Janus Kinase (JAK) und den *signal transducer and activator transcription* (STAT) Signalweg [58, 63]. Die transkriptionelle Aktivierung des Interferon-regulierenden Faktors (IRF1) führt zu dessen Bindung an den *PDL1*-Promotor [60].

1.8.2 Mögliche Interaktion von PD-L1 und PPAR γ

In Bezug auf das kolorektale Karzinom ist besonders die Verbindung zu den erwähnten onkogenen Hauptachsen der EGFR-assoziierten Signalwege über die PI3K und RAS interessant. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von MEK1/2-Inhibitoren die PD-L1-Expression erhöht werden konnte. Dadurch wiederum wurde eine Sensitivierung von KRK gegenüber Checkpoint-Inhibitoren erreicht [64]. Die über PI3K-AKT vermittelte mTORC-Aktivierung scheint diesem Effekt entgegenzuwirken [58]. Die Interaktion zwischen RAS und PPAR γ wurde bereits beschrieben. Aufgrund der Abschwächung der genomischen Funktion PPAR γ s durch MEK1 [52] (Abb. 8) erscheint eine gegenseitige Beeinflussung von PPAR γ und PD-L1 möglich.

In Studien konnte festgestellt werden, dass PPAR-Agonisten, wie Bezafibrate, zu einer verbesserten Funktion von PD-1-Checkpoint-Inhibitoren führen. Dies wird durch eine Veränderung des Metabolismus von CD8-positiven T-Zellen erklärt. Es kommt zu einer Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse in den T-Zellen und verbessert deren Immunfunktion [65].

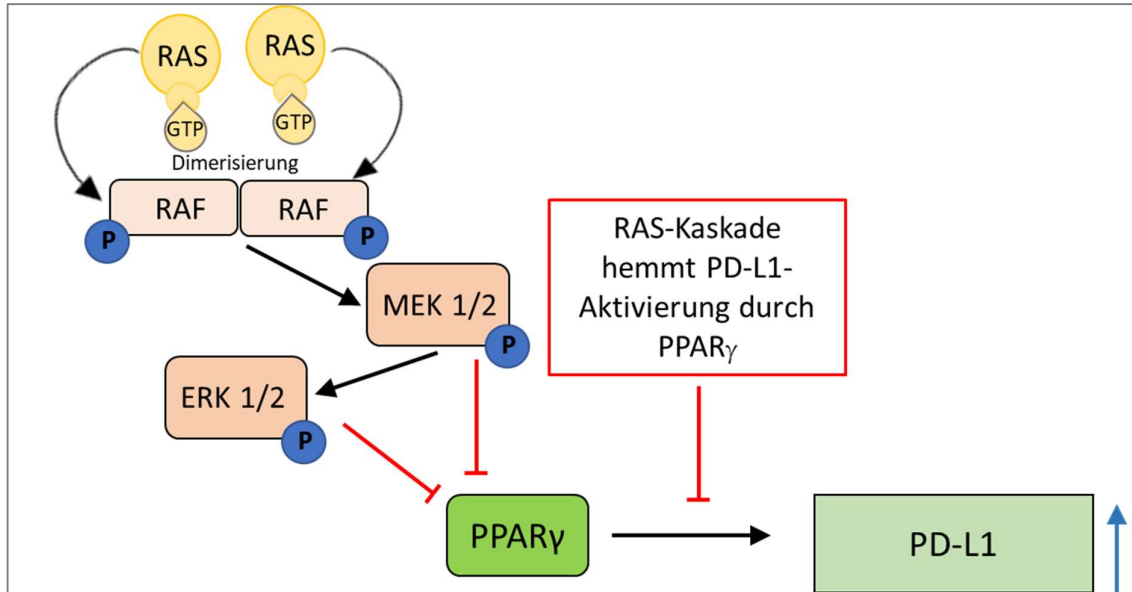


Abbildung 8: Mögliche Transduktion: RAS-Kaskade, PPAR γ und PD-L1

Die durch RAS aktivierte MEK 1/2 und ERK 1/2 hemmen PPAR γ [52]. Dadurch könnte eine durch PPAR γ vermittelte PD-L1-Expression verringert sein.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass PPAR γ anti-inflammatorische Effekte auf Makrophagen hat. PPAR γ moduliert die Veränderung des Phänotyps von Makrophagen vom pro-inflammatorischen M1 zum anti-inflammatorischen Typ M2 [66]. Die immuninhibierende Funktion von PPAR γ und die Einbindung in dieselben intrazellulären Signalkaskaden deutet auf eine sich positiv beeinflussende Interaktion von PPAR γ und PD-L1 hin [67]. Diese könnte eine verbesserte Effektivität von Checkpointinhibitoren zur Folge haben [65]. So wurde gezeigt, dass PPAR-Aktivierung in Verbindung mit PD-1-Blockade die Effektivität der Therapie erhöht.

Eine genauere Interaktion von PD-L1 sollte im Weiteren untersucht werden.

1.8.3 Induzierte Verstärkung der PD-L1-Expression

Antikörper gegen PD-L1 zeigten vielversprechende Ergebnisse in dem klinischen Einsatz gastrointestinaler Tumoren [68]. Damit geht die Frage einher, ob sich die Effektivität von Checkpointinhibitoren durch eine gezielte Verstärkung der PD-L1-Expression erhöht und sich dadurch die klinische Therapie prognostisch verbessern ließe. Diese Hypothese gilt es bislang noch zu klären.

1.9 NF κ B

NF κ B kommt eine Schlüsselrolle in immunvermittelten Antworten bezüglich des Zellüberlebens und von Entzündungen zu. Der Bezug zu kolorektalen Karzinomen besteht unter anderem aufgrund der Verbindung von Colitis-assoziierten Karzinomen (CAC). Die Dysregulation des NF κ B-Signalweges zählt zu den Pathomechanismen

von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). In der Entstehung sporadischer kolorektaler Karzinome sind ebenfalls aktivierende Mutationen von NF κ B-Signalwegen zu beobachten. So bindet NF κ B an den Promotor der Zellzyklus-regulierenden Gene *Cyclin D1*, *D2* und *D3* [69]. Die Tumorgenese-fördernde Wirkung zeigt sich auch in der Aktivierung verschiedener anti-apoptotischer Gene [70, 71]. Die Aktivierung proliferativer Signalgene konnte ebenfalls festgestellt werden, jedoch ist ein proliferativer Effekt durch NF κ B nicht gesichert [72]. Insgesamt lässt sich allerdings festhalten, dass NF κ B aufgrund einer konstitutiven Aktivierung von rund 40% aller kolorektalen Karzinompatienten ein relevantes Ziel in der Anti-Tumorthherapie darstellen könnte [73, 74].

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 sind unter anderem Aktivatoren des NF κ B-Signalweges. Sie werden durch PPAR γ gehemmt [50]. Eine Beeinflussung des NF κ B-Signalweges durch PPAR γ -Agonisten oder Partialagonisten lässt sich daher vermuten.

1.10 Myotubularine

Diese Arbeit skizziert den Einfluss des Myotubularins MTMR7 auf die bereits erwähnten Signalkaskaden. Myotubularine bilden eine Untergruppe der Lipidphosphatasen. Sie dephosphorylieren PtlIns(3)P und PtlIns(3,5)P. Gemein ist ihren Proteinen dieselbe Grundstruktur. Dennoch unterscheiden sich einzelne Myotubularine in ihrer Funktion teils erheblich, was u.a. mit ihrer subzellulären Lokalisation zusammenhängt. Es sind bislang 16 Myotubularine bekannt: Während das zuerst bekannte Protein als MTM1 abgekürzt wird, wurden die anschließend entdeckten Vertreter als *Myotubularin Related Protein 1-15* (MTMR1-15) bezeichnet [75, 76]. Myotubularine beeinflussen den Vesikeltransport, proliferative Kinasekaskaden, die Autophagie und die Funktion von Ionenkanälen. Zudem werden durch sie zentrale Signalkaskaden durch ihre Interaktion mit sekundären Botenstoffen beeinflusst [75, 77]. In diesem Kontext spielt die Konzentration von Phosphoinositolen als Substrat von Myotubularinen eine wichtige Rolle.

1.10.1 Struktur der Myotubularine

Die meisten Myotubularine sind strukturell aus fünf Domänen aufgebaut. Sie besitzen eine *Pleckstrin-Homology-Glucosyltransferase Rab-like GTPase Activator*-Domäne, kurz PH-GRAM-Domäne. Des Weiteren besitzen sie eine *Rac-Induced Recruitment*-Domäne (RID-Domäne), eine Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domäne (PTP-Domäne) mit katalytischem Zentrum, eine Set-Interaction-Domäne (SID), sowie eine *Coiled-coil*-Domäne mit Heterodimerisierungsfunktion [75, 78].

Der Aufbau wird in Abbildung 9 dargestellt.

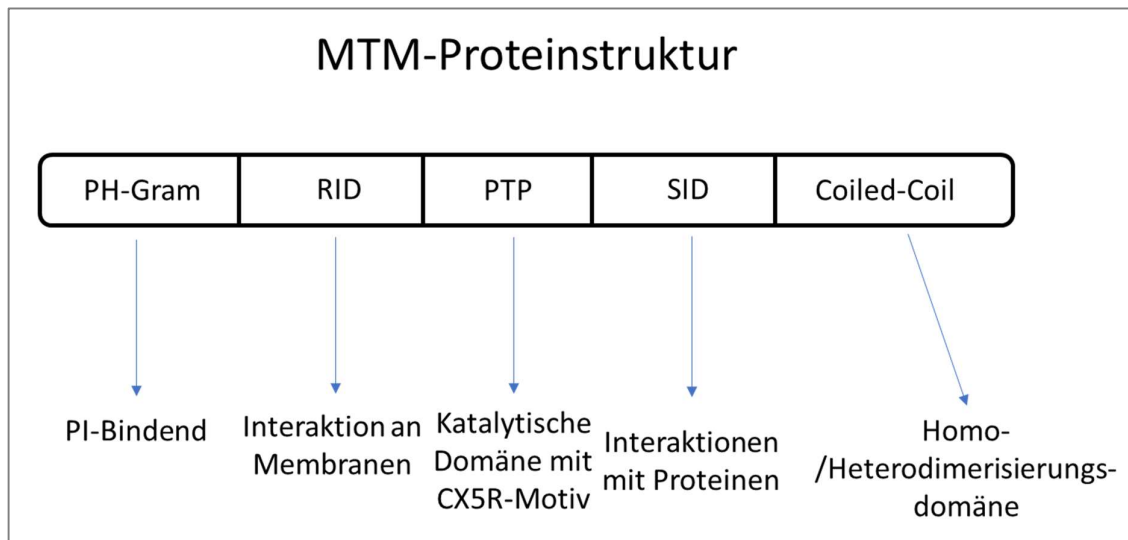


Abbildung 9: Aufbau der Myotubularine [79]

Die katalytische PTP-Domäne besitzt ein CX5R-Motiv. CX5R-Motive sind typische Merkmale von Proteinphosphatasen, wobei Myotubularine die Besonderheit aufweisen, dass sie ausschließlich Phosphoinositole dephosphorylieren und keine anderen Proteinmodifikationen [80]. Die Substratspezifität zu Phosphoinositolen wird durch drei strukturelle Besonderheiten gewährleistet: Die Oberfläche der Myotubularine weist positive Ladungen auf, dadurch kommt es zu einer unspezifischen Kopplung an negativ geladene Phosphoinositole. Die Größe der Substratbindetasche von Myotubularinen ist abgestimmt auf Phosphoinositole. Außerdem schützt eine hydrophobe Helix die Substratbindetasche und garantiert so eine spezifische Selektivität zu lipophilen Substraten, dadurch kommt es zu der Interaktion mit Phosphoinositolen [80]. Die stärkste Affinität der Substratbindetasche besteht gegenüber der sich am Inositolring an Position 3 befindenden Phosphatgruppe. Vor allem beim $\text{PtlIns}(3)\text{P}$ und beim $\text{PtlIns}(3,5)\text{P}_2$ trifft dies zu. Die Bindung an Phosphoinositole wird über die PH-GRAM-Domäne vermittelt [75]. Dabei werden die Substrate $\text{PtlIns}(5)\text{P}$, $\text{PtlIns}(3,5)\text{P}_2$, $\text{PtlIns}(4)\text{P}$, $\text{PtlIns}(3)\text{P}$ und $\text{PtlIns}(3,4,5)\text{P}_3$ [81] an das Myotubularin gebunden. In der Interaktion mit verschiedenen Phosphoinositolen spielt sie ebenfalls eine Rolle [78]. Ein zentrales Element der Regulation der Myotubularine ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren. Die *Coiled-Coil*-Domäne fungiert dabei als Homo- oder Heterodimerisierungsdomäne [75]. Myotubularine bilden aber auch Verbindungen mit Proteinen anderer Klassen, wie zum Beispiel der PI3K Klasse 3 [82]. Die SID vermittelt die Interaktion mit anderen Proteinklassen, kann allerdings auch die durch die *Coiled-Coil*-Domäne vermittelte Myotubularin-Dimerisierung verstärken. Neben den oben erwähnten Substraten weisen MTMR7 und MTMR14 als Besonderheit ebenfalls eine Aktivität gegenüber $\text{PtlIns}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PtlIns}(4,5)\text{P}_2$ auf [75]. Die oben erwähnte subzelluläre Lokalisation der Myotubularine ist für ihre funktionelle Aktivität maßgeblich entscheidend. Die Domänen SID und CX5R regulieren die subzelluläre Lokalisation. Die inaktiven Myotubularine zeichnen sich durch einen Austausch der sich im katalytischen Zentrum befindlichen Aminosäuren Arginin oder Cystein durch andere Aminosäuren aus [79, 80] und stellen als Homo- oder Heterodimerisierungspartner zentrale regulatorische Kofaktoren der enzymatisch aktiven MTMs dar.

1.10.2 Subzelluläre Lokalisation und Klassifikation

Die funktionelle Einteilung der Myotubularine in verschiedene Komplexformen erscheint am sinnvollsten. Dabei geht es um die durch die *Coiled-Coil*-Domäne vermittelte Dimerisierung: Aktive Myotubularine können diese Komplexe sowohl mit anderen aktiven oder inaktiven Myotubularinen bilden und mit diesen in verschiedenen subzellulären Kompartimenten interagieren. Die erste Gruppe beinhaltet als aktive Enzyme MTM1 und MTMR2, die Komplexe mit den inaktiven Myotubularinen MTMR10 und MTMR12 und im Fall von MTMR2 zusätzlich mit MTMR13 und MTMR5 bilden. Die zweite Gruppe beinhaltet die ausschließlich aktiven MTMR3 und MTMR4. Die aktiven MTMR6, MTMR7 und MTMR8 nehmen eine Komplexform mit dem inaktiven MTMR9 ein. MTMR11 scheint ein inaktives Myotubularin zu sein, das sich nicht eindeutig in eine der drei genannten Gruppen einordnen lässt [75]. MTMR14 besitzt keine *Coiled-Coil*-Domäne, was eine Interaktion unwahrscheinlich macht. MTMR15 hingegen wird auch als FAN1 bezeichnet und stellt in seiner Funktion als DNA-Reparaturgen eine Besonderheit dar [80]. MTMR15 ist mit den Myotubularinen der vorherig genannten drei Gruppen daher ebenfalls nicht vergleichbar.

1.10.3 Regulation

Die Regulation findet durch Interaktion von Myotubularinen untereinander statt. Dabei kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des enzymatisch aktiven Bindepartners. Die subzelluläre Lokalisation des heterodimeren Myotubularin-Komplexes wird durch die inaktiven Myotubularine vermittelt. Weitere Interaktionspartner der Myotubularine sind Proteine anderer Klassen, wie zum Beispiel die bereits erwähnten Klassen der PI3Kinase. In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits eine Aktivierung des *PPAR-Responsive elements* (PPRE) durch MTMR7 festgestellt werden [83]. Dieses Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass MTMR7 die PPAR γ -Aktivität verstärkt. Auf MTMR7 wird später genauer Bezug genommen.

1.10.4 Zelluläre Funktion und assoziierte Erkrankungen

Mutationen, die zu Defekten in Myotubularinen führen, sind bei neuromuskulären Erkrankungen bekannt. Aufzuführen sind hier die X-chromosomal rezessive myotubuläre Myopathie bei MTM1-Mutation sowie zwei Formen der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie bei MTMR2- oder MTMR13-Mutation [84-86]. Bei der genaueren Betrachtung dieser Myopathien fällt die veränderte histologische Grundordnung in den Myozyten auf. Es sind hauptsächlich rein oxidative Typ-I-Muskelfasern zu finden und damit einhergehend viele Mitochondrien, insgesamt erscheint die Muskulatur unorganisiert [87]. Die muskuläre Kalziumhomöostase scheint bei diesen Erkrankungen ebenfalls aufgrund der Myotubularin-Dysfunktion pathologisch verändert zu sein [88]. Die Pathologie dieser Erkrankungen gibt ein klinisches Beispiel für die zelluläre Funktion von Myotubularinen: So organisieren sie neben der mitochondriellen Homöostase verschiedene Zellstrukturen, wie Aktin- und Intermediärfilamente durch die Modulation ihrer Substrate, der Phosphoinositole. Ein hoher Spiegel von Ptlns(3)P und Ptlns(3,5)P₂ ist in endozytotischen Vesikeln vorhanden [87]. An der Regulation des Vesikeltransports sind Myotubularine beteiligt.

Außerdem beeinflussen Myotubularine proliferative Signalkaskaden wie den Phosphorylierungsgrad von AKT oder die Aktivität des RAS-stimulierenden EGFR [87, 89].

Dabei zeigen sich Myotubularine meist als Förderer von EGFR-vermittelten Signalkaskaden, was durch die Tatsache erklärbar ist, dass die Substrate $\text{PtlIns}(3)\text{P}$ und $\text{PtlIns}(3,5)\text{P}_2$ genauso wie die meisten Myotubularine gemeinsam hauptsächlich auf späten Endosomen lokalisiert sind [90]. Bei Überexpression verschiedener aktiver MTMs wird der Abbau des EGFR in späten Endosomen verringert [90]. Dies könnte eine Disinhibition der dem EGFR nachgeschalteten RAS-Signalkaskade zur Folge haben. MTMR7 nimmt in diesem Kontext eine Sonderrolle ein, da seine spezifische Aktivität für lösliches Inositolphosphat ($\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$) als Substrat deutlich höher ist als die Substrataktivität gegenüber den membrangebundenen $\text{PtlIns}(3,5)\text{P}_2$ und $\text{PtlIns}(3)\text{P}$ [91].

Zudem sind die genannten anti-apoptotischen Effekte der Myotubularine vor allem in neuromuskulären Geweben beobachtet worden [87]. In soliden Tumoren konnten Untersuchungen zu MTMR3 einen antiproliferativen Effekt auf NSCLC-Zelllinien beschreiben [92]. Für kolorektale Tumoren indes konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden [93].

1.10.5 MTMR7

Nach der oben beschriebenen Einteilung der Myotubularine in Komplexformen lässt sich das aktive MTMR7 in eine Gruppe mit den ebenfalls aktiven MTMR6, MTMR7 und MTMR8 sowie dem inaktiven MTMR9 einteilen. In dieser Komplexgruppe bilden die erstgenannten aktiven Myotubularine Heterodimere mit dem inaktiven Interaktionspartner MTMR9. In diesem Komplex dephosphoryliert MTMR7 die Substrate $\text{PtlIns}(3)\text{P}$, besonders auch das $\text{PtlIns}(3,5)\text{P}_2$ an der 3'-Position des Inositolrings. Zudem dephosphoryliert es freie Inositolphosphate wie $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$ [91]. In der Erstbeschreibung im Jahr 2003 wurde das MTMR7-Protein zunächst in murinem Hirngewebe nachgewiesen, seine RNA fand sich auch in Hoden-, Leber- und Nierengewebe [91]. Neben den oben genannten Geweben wird MTMR7 auch in dem murinem und humanem Gastrointestinaltrakt exprimiert. Hier kommt es vornehmlich in der glatten Muskulatur vor, besonders in der Muscularis Mucosae und den perivaskulären glatten Muskelzellen der Submukosa [94].

MTMR7 wurde bisher im Rahmen von Prionen-Erkrankungen und ZNS-Infarkten untersucht [95, 96]. In zurückliegenden Jahren wurde MTMR7 zunächst den sogenannten „*survival phosphatases*“ zugeordnet [97], zu denen auch die enzymatisch aktiven Myotubularine MTM1, MTMR1, MTMR2, MTMR6, MTMR8 und MTMR12 aufgrund der durch sie vermittelten Apoptosehemmung durch Inhibition von Caspasen zählen.

Diese Einordnung sollte speziell für MTMR7 jedoch nicht weiter vorgenommen werden. Dies beruht auf neueren Untersuchungen, welche den Einfluss des Enzyms im KRK untersucht haben. Hierbei zeigte sich, dass MTMR7 eine inhibierende Wirkung auf bereits beschriebene proliferative EGF-vermittelten Signalkaskaden hat. Weidner et al. [94] zeigten, dass MTMR7 die Proliferation von kolorektalen Karzinomzelllinien inhibiert.

Umgekehrt wurde in den Gewebeproben erkrankter Patienten häufiger ein Verlust von MTMR7 auf den Ebenen der mRNA und des Proteins detektiert. Des Weiteren wurden KRK-Proben von zugleich erkrankten Typ-2-Diabetikern untersucht. Hier zeigte sich ein durch erhöhte Seruminsulinspiegel stärkerer Verlust von MTMR7. Ein durch diese metabolischen Faktoren erhöhtes Phosphorylierungsniveau von EGFR-abhängigen Faktoren wie AKT und ERK scheint die Karzinogenese des KRK hingegen voranzutreiben. Die Schnittstelle zwischen Metabolismus und Karzinogenese von KRK kann am Beispiel der Hemmung der MTMR7-Expression durch Insulin gut dargestellt werden.

MTMR7 vermittelt jedoch die Dephosphorylierung von Ptlns(3)P. Ob dies der Grund für einen ebenfalls durch MTMR7 verminderten Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 ist, oder ob dies unabhängig von der Ptlns(3)P-Dephosphorylierung geschieht, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die durch Insulin vermittelte Phosphorylierung von AKT am Thr308-Rest, welcher Ziel von Phosphoinositolen und PI3K ist, aber auch die Phosphorylierung des Ser273-Rests, wodurch das in der Kaskade nachgeschaltete mTORC2 aktiviert wird, wird durch MTMR7 vermindert. In der KRK-Zelllinie SW480 wurde MTMR7 überexprimiert und die Zellen wurden mit EGF stimuliert. Auch hier zeigte sich die Inhibition des Phosphorylierungsgrades der beiden Kinasen ERK1/2 und AKT. Dieser Effekt konnte noch verstärkt werden, wenn die Zellen mit dem PPAR γ -Agonist Rosiglitazone behandelt wurden [94].

MTMR7 zeigt also eine Hemmung der KRK-fördernden RAS-Signalkaskade [94]. Die Hemmung dieses Signalweges wird durch die zusätzliche Aktivierung des Kernrezeptors PPAR γ verstärkt. In Protein-Interaktionsexperimenten wurde eine Komplexbildung von MTMR7 und PPAR γ festgestellt [94]. PPAR γ wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Das Phosphorylierungsniveau des Kernrezeptors wird durch MTMR7 vermindert. Die Aktivierung des Kernrezeptors durch MTMR7 scheint ein zentraler Bestandteil seiner Wirkungsweise zu sein.

Insgesamt deutet all dies auf die nachhaltige Hemmung des proliferativen Signalpfades hin. Daher lassen sich neben strukturellen Gemeinsamkeiten von MTMR7 mit anderen Myotubularinen auch funktionelle Unterschiede feststellen.

1.10.5.1 Aufbau

Das Protein hat eine Größe von 75,6kDa und es gibt eine alternative Spleißvariante von 53,9kDa [98]. Letztere besitzt keine N-terminale *Coiled-Coil*-Domäne, die für die Dimerisierung von Myotubularinen zuständig ist (s.o.).

1.10.5.2 Mögliche molekulare Interaktionen

MTMR7 bildet Heterodimere mit dem Kernrezeptor PPAR γ und verstärkt dessen Wirkung [99]. Die hemmende Wirkung des Kernrezeptors auf die EGFR-vermittelten Signalkaskaden wird unter anderem durch die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung der AF-1-Domäne [48] und die damit verbundene Änderung der subzellulären Lokalisation [52] vermindert. Die in KRK häufigen *KRAS*-Mutationen bewirken die Überaktivierung von MEK1 und ERK1/2, was wiederum die über die genannten Mechanismen die Funktion PPAR γ s mindert. Diesen Prozessen wirkt MTMR7 entgegen. In dieser Arbeit soll die verstärkte Aktivierung des Kernrezeptors durch MTMR7 weiter untersucht werden.

PPAR γ hemmt zudem Aktivatoren des NF κ B-Signalweges [50]. Eine Beeinflussung von MTMR7 auf den NF κ B-Signalweg lässt sich aufgrund seiner PPAR γ -partial-agonistischen Funktion vermuten.

Die Induktion von PDL1 durch den Kernrezeptor wurde bereits beschrieben [100]. MTMR7 könnte daher als PPAR γ -Aktivator ebenfalls die PD-L1-Expression beeinflussen.

Der WNT- β -Catenin-Signalweg gehört neben der EGFR-vermittelten Signalkaskade zu den Signalwegen, in denen Mutationen für die Pathogenese des KRK eine zentrale Rolle spielen [1, 35, 42]. Ähnlich wie bei dem EGFR-RAS-Signalweg wurde der Antagonismus von PPAR γ zum verstärkten WNT-Signalweg und deren Interaktion beschrieben. Die Komplexbildung des Kernrezeptors mit MTMR7 lässt einen Einfluss des Letzteren auf den WNT-Signalweg vermuten. Unsere Arbeitsgruppe [94] konnte ein vermindertes Zellwachstum verschiedener KRK-Zelllinien beobachten, sofern in diesen MTMR7 überexprimiert wurde. Die verwendeten Zellen weisen neben *KRAS*- auch *APC*-Mutationen auf, was einen Hinweis auf eine mögliche Verbindung zu MTMR7 gibt [98].

In Versuchen mit dem inaktiven Bindepartner MTMR9 in Bezug auf den Vesikeltransport vom Golgiapparat zur Zellmembranoberfläche konnte festgestellt werden, dass durch einen MTMR9-*Knockout* weniger WNT3A in exkretorischen Vesikeln zu finden war, was wiederum die WNT3A-Sekretion verminderte. Dies ließe eine aktivierende Funktion dieses Myotubularins vermuten. Allerdings wurde in diesen Versuchen MTMR7 explizit nicht mituntersucht, jedoch wurde festgestellt, dass die Überexpression von MTMR9 in WNT-TCF/ β -Catenin-Reporterplasmid-transfizierten HEK293T Zellen eine verringerte Reporteraktivität zur Folge hatte, was wiederum die modulierende Interaktion des MTMR7-Bindepartners MTMR9 im WNT-Signalweg nahelegt [77].

Die Wirkung von MTMR7 auf die für das KRK entscheidenden onkogenen Treibersignalwege RAS und WNT galt es daher weiterhin zu untersuchen.

1.11 Ziel der Arbeit

Der Einfluss von MTMR7 und dem in KRK häufig mutierten RAS-Signalweg wurde bereits beschrieben [94]. Ebenso konnte eine Verbindung zu dem Kernrezeptor PPAR γ hergestellt werden [99]. Unter Berücksichtigung des Mutationsspektrums der in vorherigen Versuchen untersuchten Zellsysteme und bestätigter Protein-Protein-Interaktionsdaten scheint es wahrscheinlich, dass MTMR7 nicht ausschließlich in den EGFR-RAS-Signalweg eingreift.

Der WNT- β -Catenin-Signalweg ist einerseits ein zentraler Ausgangspunkt in der Entstehung des KRK, außerdem ist die gegenseitige Beeinflussung des Signalweges mit der RAS-Kaskade und PPAR γ untersucht [56]. Auch andere Signalkaskaden, wie zum Beispiel NF κ B, interagieren mit der im KRK veränderten RAS-Signalkaskade sowie dem Kernrezeptor [16, 73]. PPAR γ und RAS könnten zudem einen Einfluss auf den durch gastrointestinale Tumoren exprimierten PD-L1 haben [64, 67, 68]. Diese für die Inflammation, Immunantwort und gastrointestinale Karzinogenese relevanten Signalwege sollten daher im Folgenden auf eine mögliche Interaktion mit MTMR7 untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Name	Firma	Bestellnummer
2-Propanol	Merck KGaA	1096341000
Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH	1.114.740.004
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	M7522
Ammoniumperoxoddisulfat	Roth GmbH	9592,3
Ethanol technisch, 96%	Roth GmbH	46139
Glycin PUFFERAN $\geq 99\%$ p.a.	Roth GmbH	3908.3
Magnesiumchlorid	Merck KGaA	5833 1000
Methanol $\geq 99,8\%$ (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	32213
PBS Dulbecco	Merck KGaA	L182-50
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth GmbH	3029.1
SDS ultra pure $\geq 99,5\%$ für die Elektrophorese	Roth GmbH	2326.2
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	31434-500G-R
TRIS PUFFERAN $\geq 99,9\%$ Ultra	Roth GmbH	4855.1
Tween® 20	Roth GmbH	9127.1
Xylol (Isomere), ROTIPURAN® $\geq 99\%$, p.a., ACS, ISO	Roth GmbH	4436.7

2.1.2 Grundlegende Materialien für die Zellkultur

Name	Firma	Bestellnummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen GmbH	41966-052
Hyclone Fetal bovine serum	Invitrogen GmbH	SV 30 160.03
L-Glutamine	Invitrogen GmbH	25030-024
PBS phosphate buffered saline pH 7,4	Invitrogen GmbH	10010-056
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH	15140-122
Tryptan Blue stain (0.4 %)	Invitrogen GmbH	15250-061
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Invitrogen GmbH	25200-056

2.1.3 Zelllinien

Name	Erkrankung/Eigenschaften	Firma
HEK293T	Abkürzung für <i>human embryonic kidney</i> ; Modellzelllinie	Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

HCT116	Humanes kolorektales Adenokarzinom	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
HT29	Humanes kolorektales Adenokarzinom	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
SW480	Humanes kolorektales Adenokarzinom	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)

2.1.4 Transfektionsversuche

Name	Firma	Bestellnummer
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Scientific™	R0532
Cell Culture Lysis 5X Reagent H2O destilliert	Promega	E1531
Luziferase Assay Reagent	Promega	E1483
MTMR7-Full-Length-Reporter	Promega	-
MTMR7-Δ-coiled-coil-Reporter	Promega	-
PUC19-DNA	Thermo Scientific	#SD0061
SRE-Reporter	Zur Verfügung gestellt von Hoffmann-La Roche AG, Basel	-
PD-L1-pGL3-Reporter	Promega	-
Topflash-TCF4/β-Catenin-Reporter	Bioscience	#60500
NFκB-Reporter	Promega	-
PPRE-TK-Reporter	Zur Verfügung gestellt von Hoffmann La Roche-AG, Basel	-

2.1.5 Stimulantien

Name	Firma	Bestellnummer
Rosiglitazone	Cayman Chemical	71740
MTMR7-CC-Peptid	ETH Zürich	-
Scrambled MTMR7-Peptid	ETH Zürich	-
Dimethylsulfoxid ≥99,7% (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D2650
Emsure® Iso-Ethanol absolute for analysis	Merck KGaA Darmstadt	100974
Recombinant Mouse WNT3a	R&D systems	1324-WN-002
SAR405	Hycultec GmbH	HY-12481
hEGF, lyophilized	Roche Diagnostics GmbH	000000011376454001
LPS	Cell Signalling	#14011
Human Interferon γ	PeproTech	J2617

2.1.6 Immunhistochemie

Name	Firma	Bestellnummer
Antigen unmasking solution	Vector Laboratories	H-3300
Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Vector laboratories	BP-9100
Hydrogenperoxidlösung $\geq 30\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	95321
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA Darmstadt	109249
Pertex® Eindeckmedium	Medite GmbH	-

2.1.7 Western Blot

Name	Firma	Bestellnummer
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	A6003-100G
Milchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	T145.2
WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection K	Advansta Inc.	K-12043-D20
Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH	1.114.740.004
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific	78430
Roti®-Mark TRICOLOR	Roth GmbH	8271.1
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2-diamin 99%	Roth GmbH	2367.3
Klarsichtfolie Window-Color luminiszierend	My-toys.de	

2.1.8 Kits

Name	Firma	Bestellnummer
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
DAB Peroxidase Substrat	Vector Laboratories	SK-4100
Vectastain® ABC kit peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories	PK-6101
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific	78441
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector laboratories	SP-2001

2.1.9 Antikörper

Firma	Antikörper	Katalognummer
Cell Signalling	Non-phospho (Active) β -Catenin (Ser45) (D2U8Y) XP® Rabbit mAb	#19807
Novusbio	Ki67 (SP6) anti rabbit IgG mAb	NB600-1252
Cell Signalling	p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	#9102
Santa Cruz	β Tubulin (H-235)	sc-9104
Cell Signalling	p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb	#2947
Cell Signalling	Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	#4060
Cell Signalling	Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) Rabbit mAb	#2965
Cell Signalling	PD-L1 (E1L3N®) XP® Rabbit mAb	#13684
Cell Signalling	Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP® Rabbit mAb	#4858
Cell Signalling	S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb	#2217
Santa Cruz	HSP90	sc-69703
Santa Cruz	Lamin A/C (H-110)	sc-20681
Cell Signaling	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7074
GE Healthcare Europe GmbH	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	NA-931V

2.1.10 Geräte

Name	Firma	Bestellnummer
Fusion Solo Blot Imager	Vilber imaging systems inc.	-
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	-
Axio Imager A.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	430005-9304-000
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	1653301 1653302
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	1703930
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH	1645050
Tecan Infinite M200 microplate reader	TECAN Group Ltd.	-
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG	5810000420
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG	EP-5415R
HERAcell® 240 Inkubator	Heraeus Holding GmbH	51026331
MultiGourmet Dampfgarer Foodsteamer FS10/FS 20, weiß	Braun GmbH	-
IKA® T10 basic ULTRA- TURRAX®	Ika.com	0003737000
Eppendorf Thermomixer 5350 Mixer	Eppendorf AG	5350 20152

Heidolph Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments	-
Julabo Wasserbad TW20 PROMAX 2020	Profilab24.com Heidolph Instruments	JUL_20001> 542-20020-00
Rocky®	Fröbel Labortechnik GmbH	-
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf AG	4982000012
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 100 – 1,000 µL, blau	Eppendorf AG	3123000063
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 10 – 100 µL, gelb	Eppendorf AG	3123000047
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0,5 – 10 µL, mittelgrau	Eppendorf AG	3123000020
Pipetus® 100-240 Volt	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG	9907200

2.1.11 Verbrauchsmaterialien im Labor

Name	Firma	Bestellnummer
Zellschaber 25cm rot	Sarstedt Inc.	83.3950
Blue-Cap-Greiner 15 ml	Greiner bio-one	188 261
Blue-Cap-Greiner 50 ml	Greiner bio-one	227 261
Cellstar cell culture flask 75 mm ³	Greiner bio-one	658 175
Cellstar cell culture flask 25 mm ³	Greiner bio-one	690 175
Cellstar cell culture dishes 6 cm	Greiner bio-one	628 160
Cellstar 6 Well cell culture plate	Greiner bio-one	657 160
Cellstar 96 Well cell culture plate	Greiner bio-one	655 180
white 96 Well non-binding Whatman™	Greiner bio-one GE Healthcare Lifescience	655904 GE10600021
Amersham™ Protran™ 0,2µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Lifescience	10600124
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 mL, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG	0030121023
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 mL, Eppendorf Quality™, farblos	Eppendorf AG	0030120086
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 mL, Eppendorf Quality™, farblos	Eppendorf AG	0030120094
Glass Coverslip	Menzel GmbH & Co. KG	631-1580
10 µl Spitze, graduiert	Starlab	S1111-3800
200 µl Spitze, gelb	Starlab	S1111-0806
1000 µl Spitze, blau, graduiert	Starlab	S1111-6801
Pipettenspitzen Filter-tip 10µl	Starlab	S1121-3810

Pipettenspitzen Filter-tip 100µl	Starlab	S1120-8810
Pipettenspitzen Filter-tip 1000µl	Starlab	S1126-7810
5 ml serological pipette	Greiner bio-one	606 180
10 ml serological pipette	Greiner bio-one	607 180
25 ml serological pipette	Greiner bio-one	760 180
50 ml serological pipette	Greiner bio-one	768 160
Superfrost® plus microscope Slides	Menzel GmbH & Co. KG	6310108

2.1.12 Software

Software	Internetseite
i-control™ Microplate Reader Software	www.tecan.com
image J	https://imagej.nih.gov/ij/
Microsoft Office	www.microsoft.com
Prism 7	www.graphpad.com

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Durchführung der Experimente wurden die humanen Zelllinien HEK293T, SW480, HCT116 und HT29 verwendet. Für die Kultivierung wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium verwendet. Es wurde angereichert mit 10% (v/v) *fetal bovine serum* (FBS), 1% (v/v) L-Glutamin und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.

2.2.2 Transfektion der Zellen

Die oben genannten Zellen wurden in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 6cm ausgesät, sodass sie eine Konfluenz von 70% erreichten. Dann wurden sie mit DMEM und Turbofect™ Transfection Reagent mit den oben aufgeführten Reporter-Plasmiden PD-L1, SRE, NFκB, Topflash-TCF4/β-Catenin und teilweise zusätzlich mit *full length* (FL)-MTMR7 oder PUC19 als negative Leervektor (*empty vector*, EV) Kontrolle nach Herstellerprotokoll transfiziert. Dafür wurde von jedem Reporter-Plasmid 2µg/ml Medium verwendet. Nach sechsstündiger Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät.

2.2.3 Luziferase Reporter Test

2.2.3.1 Behandlungen der Zellen

Die Zellen wurden mit MTMR7-CC-Peptid in den Konzentrationen 0,1; 1 und 10 µM behandelt. Das MTMR7-CC-Peptid wurde in einigen Versuchen (PD-L1, NFκB) in DMSO gelöst. Dort wurden entsprechende Mengen an DMSO als Vehikel bzw. Lösungsmittel-Negativkontrollen verwendet. In späteren Versuchsreihen (WNT-β-Catenin) wurde MTMR7-CC-Peptid in sterilem PBS pH7,4 aufgelöst und ebenfalls in den Konzentrationen 0,1; 1 und 10 µM verwendet.

2.2.3.2 NFκB-Reporter-transfizierte Zellen

Die Zellen wurden als Positivkontrolle mit 1 μM LPS behandelt, welches in DMSO gelöst wurde.

2.2.3.3 PD-L1 Promoter-Reporter-transfizierte Zellen

Die Zellen wurden als Positivkontrolle mit 10 μM Interferon γ (IFNγ) behandelt, welches in DMSO gelöst wurde. Zudem wurde in DMSO gelöstes Rosiglitazone in den Konzentrationen 0,1; 1 und 10 μM verwendet.

2.2.3.4 Topflash-TCF4/β-Catenin- Reporter-transfizierte Zellen

HEK293T Zellen wurden mit rekombinatem Maus-WNT3a behandelt (10ng/ml). SW480 Zellen wurden nicht zusätzlich mit WNT3a behandelt.

2.2.3.5 SRE-Reporter-transfizierte Zellen

Die mit dem SRE-Reporter-Plasmid transfizierten Zellen wurden über 16 Stunden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne zusätzliche Stimulantien gehungert und anschließend mit EGF oder DMEM mit 20% FBS behandelt.

Diese Experimente wurden unter einer zusätzlichen Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor SAR405 wiederholt. Dieser wurde zunächst in Ethanol gelöst. Die Proben wurden mit 1 μM SAR405 behandelt oder mit der entsprechenden Menge Ethanol ohne Zusatz.

2.2.3.6 Herstellung der Zelllysate für Luziferaseaktivitätsmessung

Nach Entfernung des Mediums aus den 6-Well-Platten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 5x Lyse Puffer in einer Verdünnung von 1/5 unter konstantem Schütteln gelöst, anschließend von der Oberfläche gekratzt und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für die Herstellung von Proben für den Western Blot und für die Messung der Luziferase-Aktivität gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.3.7 Auswertung der relativen Luziferaseaktivität

Die absolut gemessenen Luziferasesignale wurden durch den Proteingehalt der jeweiligen Probe dividiert und das für die statistische Auswertung genutzte Ergebnis als relative Luziferaseaktivität angegeben.

2.2.4 Herstellung der Zelllysate für den Nachweis von Phosphoproteinen

Nach Entfernung des Mediums, wie zuvor erwähnt, erfolgte die Lyse der Zellen für 20 Minuten auf Eis mit 4,9ml 50mM Tris-HCl, pH 7,4 + 50μl 1mM Dithioeritol + 50μl Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Die Zellüberreste wurden in Eppendorfgefäßen mittels Ultraschall-Lyse aufgeschlossen (30x/Probe) und für 10 Minuten bei 4°C mit 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für Western Blots verwendet.

2.2.5 Herstellung der Lysate für eine subzelluläre Fraktionierung

Für eine subzelluläre Fraktionierung wurden die Zellen in 6cm Platten ausgesät. Nach erfolgter Transfektion und Behandlung analog zu den bereits erwähnten Experimenten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend hypoton lysiert (500 µl HL-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 % Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific)). Die Zellen wurden nach 20 Minuten auf Eis von der Oberfläche abgekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Sie wurden bei 4°C mit 7000 rpm zentrifugiert und der Überstand, welcher die zytosolische Fraktion enthielt, abgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Die feste Fraktion wurde mit eiskaltem HL-Puffer gewaschen. Danach wurden 60µl HS-Puffer (HL-Puffer mit 450mM NaCl) hinzugegeben und die Proben bei 4°C und 21000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher die nukleäre Fraktion enthielt, wurde abgenommen. Das zurückbleibende Pellet enthielt Membranen, Zytoskelett und Matrix. Es wurde mit eiskaltem HS-Puffer gewaschen und mit SDS-Lysepuffer versetzt (50 mM Tris HCl, pH 7.6, 2 % (w/v) SDS), bei 4°C bei 21000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend bei -80°C tiefgefroren. Aus den Proben wurden Western Blots erstellt.

2.2.6 Western Blot

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde nach Herstellerprotokoll des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) bestimmt. Die Proben wurden durch unterschiedliche Verdünnung auf dieselbe Proteinkonzentration gebracht und anschließend mit 20% 5x SDS-Ladepuffer (Bromphenolblau + 62,5 mM TRIS-base pH10 + 10% (w/v) SDS + 5% (v/v) β-Mecaptoethanol + 50% (v/v) Glycerol) für 10 Minuten bei 99°C erhitzt.

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Reagenz	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel 4%
H ₂ O	3,29 ml	2,59 ml	1,53 ml
Acrylamid (30%)	2,8 ml	3,5 ml	333 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,1 ml	2,1 ml	-
0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	-	-	625 µl
SDS (10%)	83 µl	83 µl	25 µl
APS (10%)	42 µl	42 µl	12,5 µl
TEMED	2,8 µl	2,8 µl	2,5 µl

Nach dem Beladen liefen die Proben in den Gelen bei 30 mA konstant in dem Mini-PROTEAN® 3 Cell system (Bio-Rad Laboratories). Dafür wurde Laufpuffer verwendet, der 192 mM Glycin, 25 mM TRIS-base und 0,1% (w/v) SDS enthielt.

2.2.6.2 Übertragung und Nachweis der Proteine

Nach dem Auftrennen in einzelne Fraktionen wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman) transferiert. Dafür wurde eine Transferkammer genutzt (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad Laboratories), die mit Transferpuffer befüllt wurde (192 mM Glyzin, 25 mM Tris-base, 20% (v/v)

Methanol). Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für eine Stunde durchgeführt.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in Ponceau Rot gefärbt und entweder in T-PBS mit 5% BSA oder 5% Magermilchpulver je nach Antikörper-protokoll als Blockierlösung in unter Raumtemperatur für eine Stunde unter konstantem leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für 5 Minuten in T-PBS gewaschen und danach mit dem Primärantikörper in T-PBS mit 5% BSA oder Milch über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x für 5 Minuten mit T-PBS gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% (w/v) Milch oder BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten mit T-PBS wurden den Membranen ECL Detektionsreagenz (*Western Bright Sirius HRP substrate*) nach Herstellerprotokoll hinzugegeben.

In einer Dunkelkammer (*Fusion Solo, blot imager*) wurden die Membranen für entsprechende Zeiten belichtet. Anschließend wurden die Bilder digital mit dem Programm Image J ausgewertet.

2.2.7 Immunhistochemie

2.2.7.1 Durchführung der Immunhistochemie

Zunächst erfolgte die Rehydrierung der Schnitte in Xylol für 10 Minuten, anschließend nochmals für 5 Minuten. Dann wurden sie jeweils für 6 Minuten in 96%igem Ethanol, danach in 80%igem und 70%igem (v/v) Ethanol rehydriert. Zuletzt wurden die Schnitte für 2 Minuten in dH₂O rehydriert. Darauf folgte die Antigendemaskierung in erhitzter Antigendemaskierungslösung (10 mmol/L Zitratpuffer (pH 6.0)) für 40 Minuten in einem Dampfgerät (Braun MultiGourmet Dampfgerät Foodsteamer FS10/FS 20, weiß). Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte 3x für 2 Minuten in PBS gewaschen und für 20 Minuten in 3% H₂O₂ inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS (3x für je 2 Minuten) wurden die Proben mit Ziegenantiserum (5% (v/v) in 1% (w/v) BSA) in PBS und 4 Tropfen Avidin (Avidin/Biotin Blocking Kit) pro ml Lösung für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur geblockt. Die Proben wurden nach erneutem Waschen (s.o.) in Ziegenantiserum (5% (v/v) in 1% (w/v) BSA) in PBS und 4 Tropfen Biotin (Avidin/Biotin Blocking Kit) zusammen mit dem jeweiligen Primärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Die bei diesen Versuchen beschriebenen monoklonalen Antikörper sind in Tab. 2.1.9 aufgelistet.

Die Primärantikörperkonzentration von 1:400 zeigte dabei das beste Ergebnis in der Färbung und wurde verwendet. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in Ziegenantiserum (5% (v/v) in 1% (w/v) BSA) in PBS mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (*Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Vector Laboratories*) in einer Konzentration von 1:500 für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die ABC-Mischung (*Vectastain, Vector Laboratories*) nach Herstellerangaben vorbereitet. Nach erneutem Waschen wurden die Proben mit der ABC-Mischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte eine Färbung mit einer Lösung, die sich nach den Herstellerangaben des DAB-Peroxidase Substrates (*Vector Laboratories*) richtete. Nach Inkubation mit der DAB-Substrat-Mischung, wurde die Färbung der Proben in dH₂O beendet. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für wenige Sekunden durchgeführt und diese in Leitungswasser beendet. Abschließend wurden die Schnitte in der umgekehrten Reihenfolge des Anfangs in 70%igem, 80%igem und

96%igem Ethanol dehydriert und anschließend in Xylol reparaffiniert. Die Schnitte wurden mit Eindeckmedium und einem Deckglas versiegelt.

2.2.7.2 Auswertung der Immunhistochemie

Für die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Proben nach der Antikörperbehandlung gegen aktives β -Catenin und ERK 1/2 ausgewertet, indem die nukleäre Färbung quantifiziert wurde. Bei den Proben, bei denen der Ki67-Antikörper angewandt wurde, wurden die Ki67-positiven Zellen pro μm^2 gezählt und als Ki67-Index miteinander verglichen.

2.2.7.3 Behandlung der C57BL6/J Mäuse (pCEA-SV40-Tag)

Weibliche Mäuse eines Magentumormodells (pCEA-SV40-Tag) [101] wurden nach Alter (2 Monate) und Gewicht (20g) randomisiert und in verschiedene Behandlungsgruppen mit einer jeweiligen Gruppengröße < 10 Tieren eingeteilt. Sie wurden für 14 Tage entweder mit der CC-Variante des MTMR7-Peptids oder mit dem Kontrollpeptid (*scrambled*) behandelt. Die Vergleichsgruppe wurde mit DMSO behandelt. Alle Tiere erhielten je 30 mg/kg der jeweiligen Behandlung an 4 Tagen in der Woche als intraperitoneale Injektion. Die untersuchten Proben stammen aus dem Magengewebe (Tierversuchsgenehmigung (G-188/18, Baden-Württemberg).

2.3 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 7 statistisch ausgewertet. Es wurden Experimente einer Zelllinie stets mindestens 3x mit verschiedenen Passagen durchgeführt. Zunächst wurden Tests auf Normalverteilung durchgeführt, anschließend wurde auf Signifikanz getestet. Für normalverteilte Daten wurden t-Tests für verbundene oder unabhängige Stichproben verwendet, bei dem Vorliegen mehrerer getesteter Gruppen gegeneinander wurde die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurden für verbundene Stichproben der Wilcoxon-*matched pairs* t-Test bzw. der Friedman-Test, für unabhängige Daten wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Für die quantitative Auswertung der Western Blots wurde das Programm Image J verwendet. Dabei wurden die Intensitäten der optischen Dichte gemessen. Verglichen wurden dabei die optischen Dichten nach Behandlung eines Primärantikörpers und die Behandlung mit einem Korrespondenzantikörpers als Abgleich.

3 ERGEBNISSE

3.1 MTMR7-CC-Peptid verstärkt die PPRE Promotoraktivität

In vorherigen Untersuchungen [98] konnte die Interaktion von MTMR7 und PPAR γ bereits gezeigt werden. In Überexpressionsversuchen wurde eine verstärkte PPRE-Aktivität in MTMR7-FL transfizierten Zellen nachgewiesen [9, 98]. Die Interaktion von PPAR γ und MTMR7 wurde dadurch dargestellt. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurden PPRE-transfizierte Zellen mit dem MTMR7-CC-Peptid in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die verstärkte Luziferase-Aktivität konnte bei den Peptid-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 10).

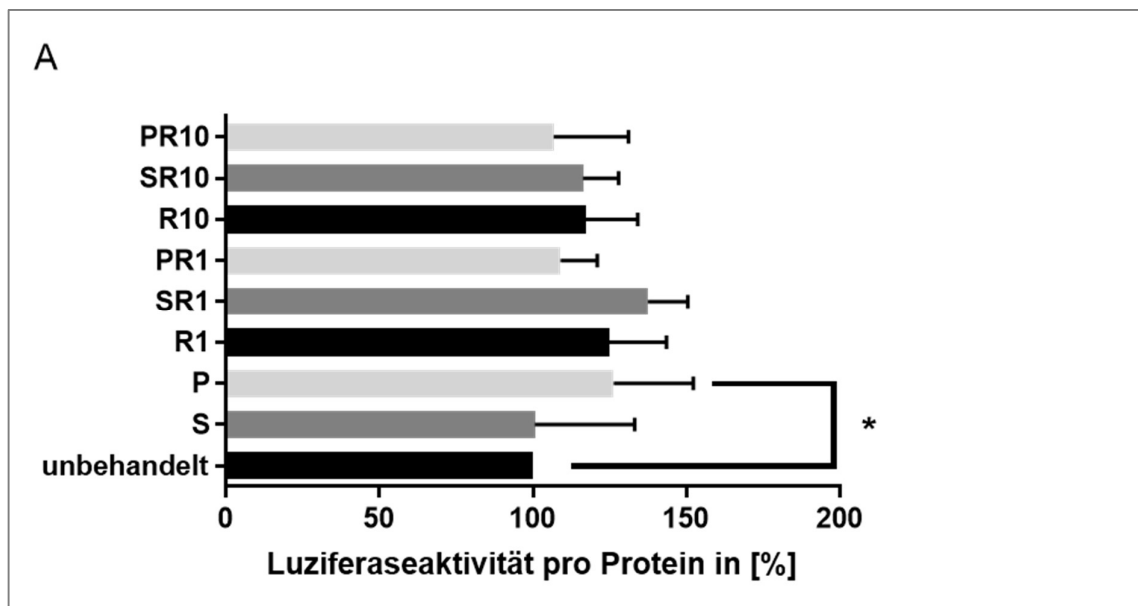
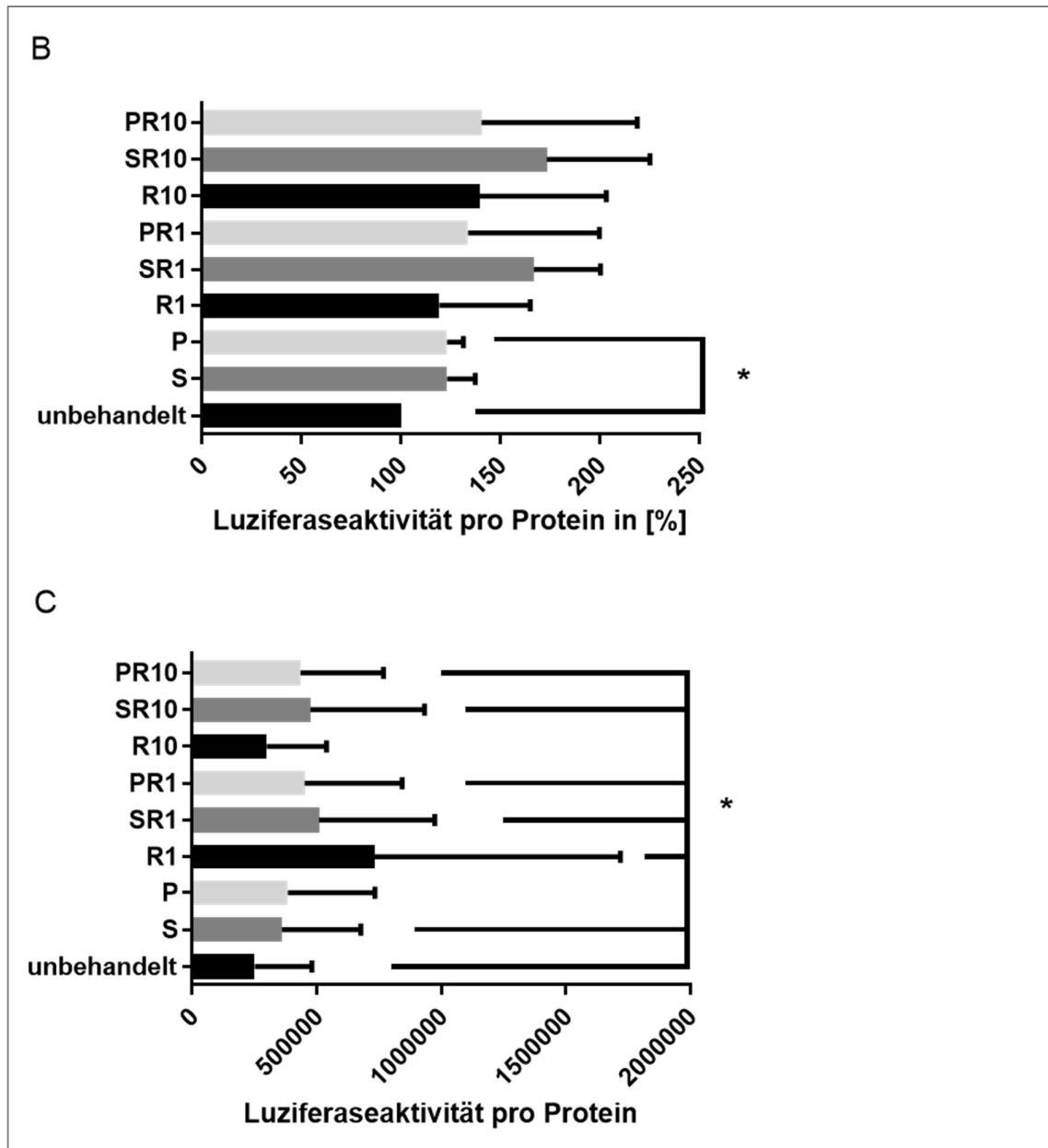


Abbildung 10: MTMR7-CC/Rosiglitazone verstärken PPRE-Promotoraktivität

Die Zelllinien wurden mit dem PPRE-Reportervektor transfiziert und anschließend behandelt. Dabei wurden 1 μ M MTMR7-CC-Peptid (P) oder 1 μ M Kontrollpeptid (S; scrambled) verwendet. Zudem wurden sie mit 1 μ M oder 10 μ M Rosiglitazone (R) behandelt, welches als PPAR γ -Agonist die PPRE-Aktivität verstärkt [102, 103]. Es konnte eine verstärkte Luziferaseaktivität bei den MTMR7-CC-Peptid behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben festgestellt werden. In Kombination mit 1 μ M Rosiglitazone zeigte sich die größte Aktivitätssteigerung. Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

10A: MTMR7-CC verstärkt die PPRE-Promotoraktivität in SW480

SW480-Zellen wurden in oben beschriebener Weise behandelt. Die Luziferaseaktivität wurde auf das Niveau der unbehandelten Proben normalisiert, da die Daten eine Normalverteilung aufwiesen (unbehandelt; S; P). Bei der Auswertung der normalverteilten Daten konnte in der Gruppen-vergleichenden Analyse keine signifikante Veränderung nach Behandlung festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, $P=0,0682$, 9 Gruppen). Da die Gruppe der nicht zusätzlich mit Rosiglitazone-behandelten Proben den unabhängigen Effekt von MTMR7-CC zu den unbehandelten Proben vergleicht, wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität im Vergleich zwischen den unbehandelten Proben und den mit dem MTMR7-CC-Peptid behandelten Proben (P vs. unbehandelt: $n=6$, $P=0,0313$; Wilcoxon *matched-pairs signed rank t-Test*).



10B: MTMR7-CC verstärkt die PPRE-Promotoraktivität in HCT116

HCT116-Zellen wurden derselben Behandlung unterzogen. Erneut wurde bei normalverteilten Daten (unbehandelt; S; P) die Luziferaseaktivität auf das Niveau der unbehandelten Proben normalisiert. Bei der Auswertung der normalverteilten Daten konnte in der Gruppen-vergleichenden Analyse keine signifikante Veränderung nach Behandlung festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test, $P=0,4542$, 9 Gruppen). Da die Gruppe der nicht zusätzlich mit Rosiglitazone-behandelten Proben den unabhängigen Effekt von MTMR7-CC zu den unbehandelten Proben vergleicht, wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse durchgeführt. In dem Vergleich zwischen den unbehandelten Proben und den mit dem MTMR7-CC-Peptid behandelten Proben zeigte sich erneut ein signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität (P vs. unbehandelt: $n=3$; $P=0,0321$, *one-sample t-Test*).

10C: MTMR7-CC/Rosiglitazone verstärken die PPRE-Promotoraktivität in HEK293T

Bei HEK293T-Zellen zeigte sich nach der Behandlung ein signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität ($n=6$, unbehandelt vs. S: $P=0,0351$; unbehandelt vs. R1: $P=0,0137$;

unbehandelt vs. SR1: P= 0,0001; unbehandelt vs. PR1: P= 0,0065; unbehandelt vs. SR10: P= 0,0110; unbehandelt vs. PR10: P= 0,0083; Wilcoxon *matched-pairs signed rank* t-Tests). Da nach der Testung auf eine Normalverteilung bei allen Proben, abgesehen von den mit 1µM Rosiglitazone behandelten (R1) normalverteilte Daten vorlagen, konnte nach Normalisierung der Werte auf die unbehandelten Proben (unbehandelt=100) nach Durchführung einer 1Faktor-ANOVA ebenfalls signifikante Reduktionen der Luziferaseaktivität dargestellt werden (unbehandelt vs. SR1: P= 0,0007; unbehandelt vs. PR1: P= 0,0176; unbehandelt vs. PR10: P= 0,0450). Dargestellt in Abb. 10C sind die nicht normalisierten Originalwerte mit den Signifikanzen nach jeweiliger Wilcoxon-t-Testung.

3.2 Rosiglitazone und MTMR7-CC steigern die PD-L1-Promotoraktivität

PD-L1 nimmt in der heutigen Tumorthherapie eine duale Rolle ein. Einerseits wird es von Tumoren zur Immunevasion exprimiert [60] und andererseits stellt es einen Angriffspunkt für Checkpointinhibitoren dar. Auch kolorektale Karzinome können durch Checkpointblockade therapiert werden [104]. Eine mögliche Beeinflussung von PD-L1 durch PPAR γ wurde eingangs erläutert [64, 68]. Um dies genauer zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit einem *PDL1*-Promotor-Reporterplasmid [100] transfiziert. Sie wurden mit dem PPAR γ -Agonist Rosiglitazone behandelt und die Luziferase-Aktivität gemessen. Ein signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität konnte mit steigender Konzentration von den Rosiglitazone-behandelten Proben gemessen werden. Ebenfalls überprüft wurde dieser Effekt in der kolorektalen Tumorzelllinie HCT116. (Abbildung 11).

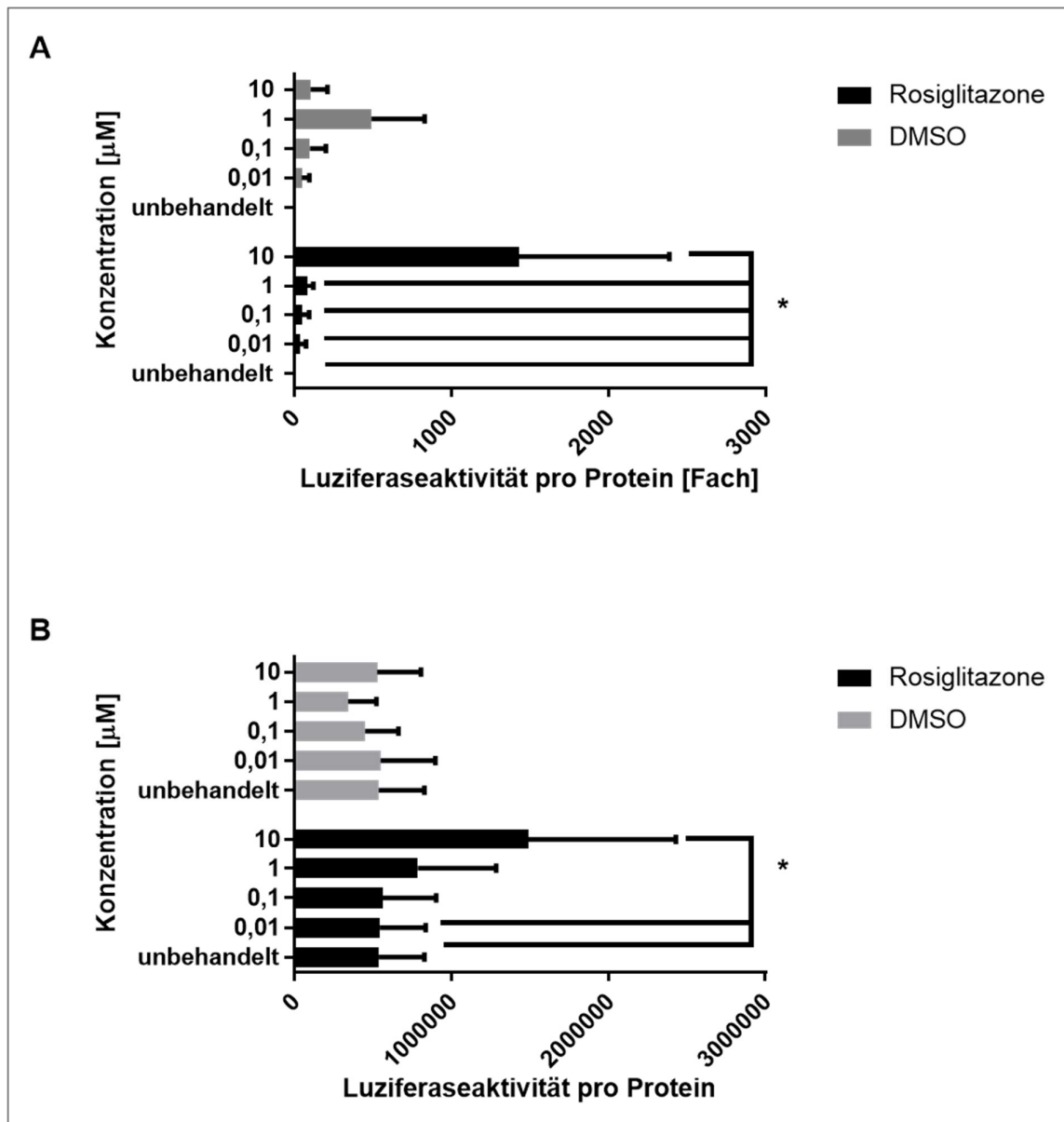


Abbildung 11: Rosiglitazone verstärkt die PD-L1-Promotoraktivität

Die Zelllinien HEK293T und HCT116 wurden mit dem *PDL1*-Promotor-Reportervektor transfiziert und anschließend mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die relative Luciferaseaktivität entspricht der Luciferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

11A: Rosiglitazone verstärkt die PD-L1-Promotoraktivität in HEK293T-Zellen

Bei den verwendeten HEK293T-Zellen zeigte sich eine erhöhte PD-L1-Luziferaseaktivität bei den Proben, die mit einer höheren Konzentration an Rosiglitazone behandelt wurden ($n=5$, 2Faktor-ANOVA, normalisiert auf unbehandelte Proben (x-Fach): unbehandelt vs. 10 μM Rosiglitazone: 0,01 μM vs. 10 μM ; 0,1 μM vs. 10 μM ; 1 μM vs. 10 μM : jeweils $P<0,05$).

11B: Rosiglitazone verstärkt die PD-L1-Promotoraktivität in HCT116-Zellen

Bei den kolorektalen HCT116-Zellen zeigte sich ebenfalls bei den mit höheren Konzentrationen an Rosiglitazone behandelten Proben eine erhöhte PD-L1-Luziferaseaktivität ($n=9$, Normalverteilung für DMSO- und Rosiglitazone-behandelte Proben gegeben; 2Faktor-ANOVA, unbehandelt vs. 10 μM : $P=0,0462$; 0,01 μM vs. 10 μM : $P=0,0490$).

In vorhergehenden Untersuchungen wurde die Interaktion von MTMR7 und PPAR γ genauer untersucht und dabei ein positiv-regulatorischer Einfluss von MTMR7 auf die Aktivität des Kernrezeptors detaillierter beschrieben [83, 98].

Eine Beeinflussung der *PDL1*-Promotoraktivität durch MTMR7-CC wurde daher nachfolgend untersucht. Dafür wurden transfizierte HEK293T- und HCT116-Zellen mit MTMR7-CC-Peptid behandelt und anschließend erneut die Luziferaseaktivität gemessen (Abbildung 12).

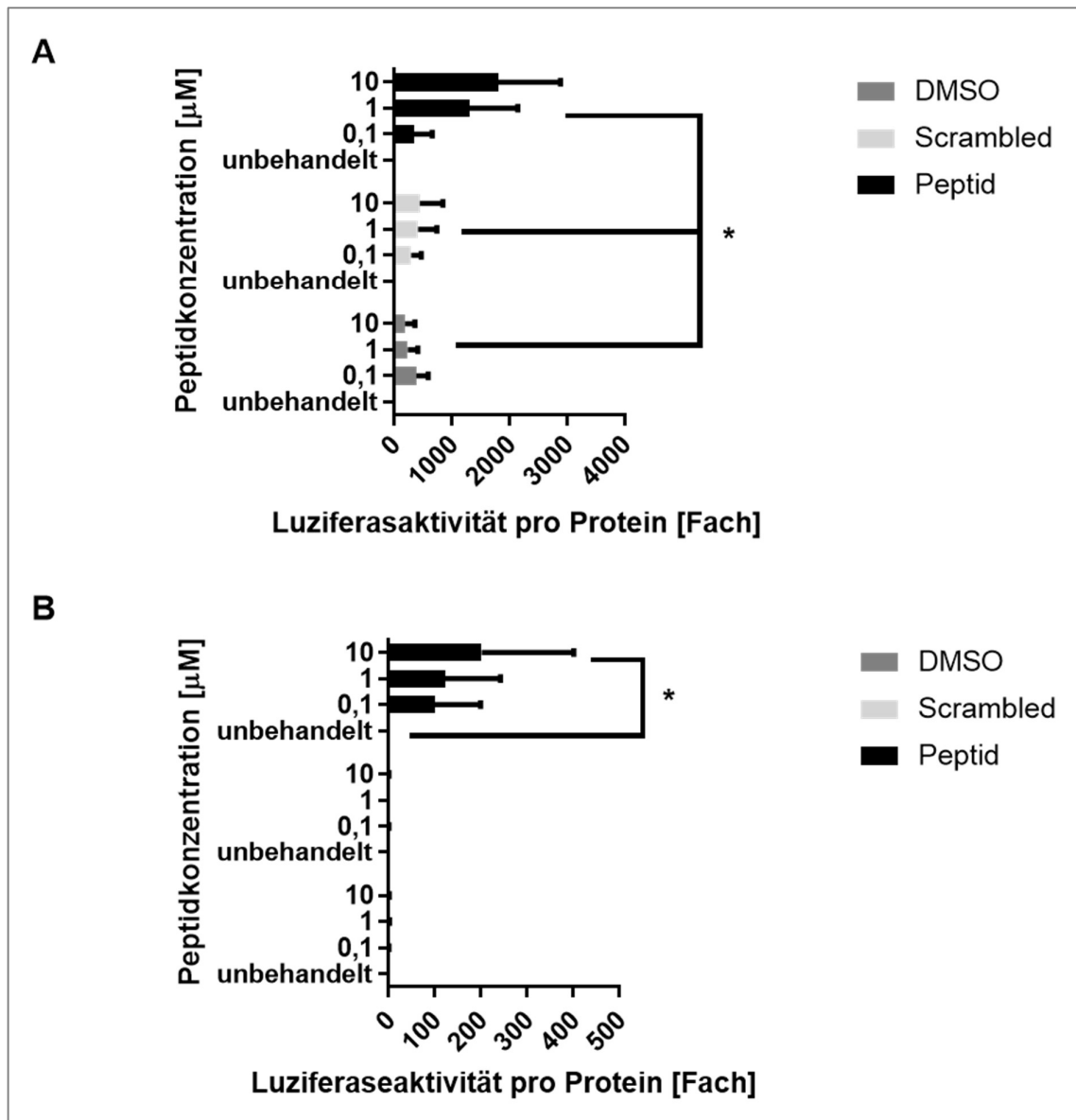


Abbildung 12: MTMR7-CC verstärkt die PD-L1-Promotor-Aktivität

Die Zelllinien HEK293T und HCT116 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des MTMR7-CC-Peptids behandelt und mit der veränderten Variante (Scrambled Kontrolle) und dem Lösungsmittel DMSO verglichen. Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

12A: MTMR7-CC-Peptid verstärkt die PDL1-Promotoraktivität in HEK293T-Zellen

Bei den mit MTMR7-CC-Peptid behandelten HEK293T-Zellen konnte eine verstärkte Luziferaseaktivität beobachtet werden (n=5, normalisiert auf unbehandelte Proben (x-Fach), 2Faktor-ANOVA: DMSO 1µM vs. Peptid 1µM: P=0,0173; Scrambled 1µM vs. Peptid 1µM: P=0,0370).

12B: MTMR7-CC-Peptid verstärkt die PDL1-Promotoraktivität in HCT116-Zellen

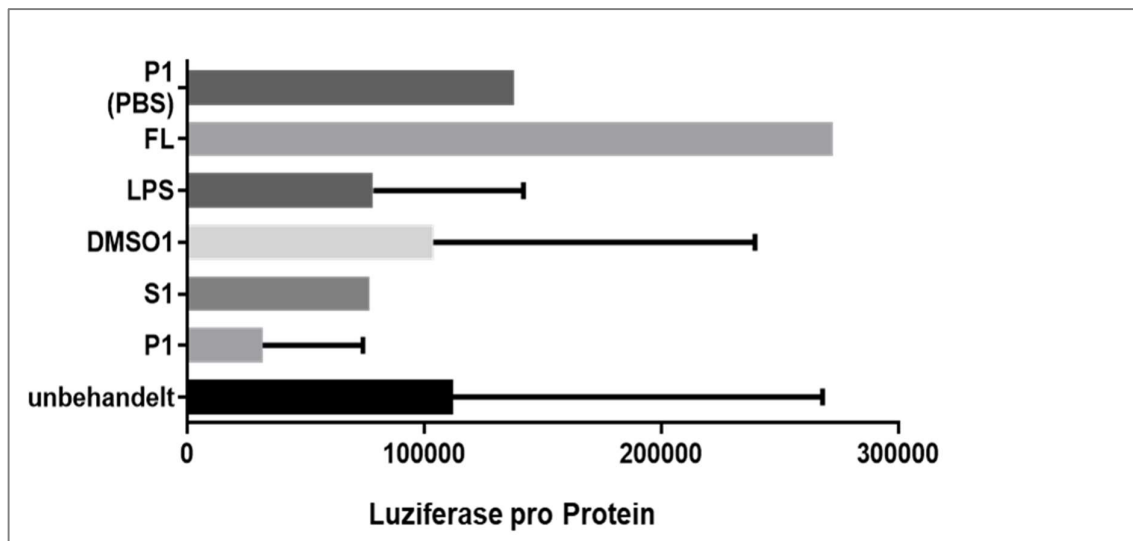
Bei den mit MTMR7-CC-Peptid behandelten HCT116-Zellen konnte ebenfalls eine verstärkte Luziferaseaktivität beobachtet werden (n=5, normalisiert auf unbehandelte Proben (x-Fach), 2Faktor-ANOVA: unbehandelt vs. Peptid 10µM: P= 0,0391).

Auch in diesen Experimenten konnte eine gesteigerte Luziferaseaktivität nach MTMR7-CC-Peptidbehandlung beobachtet werden, was auf eine Verstärkung der PDL1-Expression durch MTMR7 hindeutet.

3.3 Untersuchung zur Interaktion von MTMR7 und NFκB

MTMR7 besitzt eine PPAR γ -partial-agonistische Wirkung und PPAR γ ist ein Gegenspieler des NFκB-Signalweges [50]. Daher sollte eine mögliche Interaktion von MTMR7 in diesem Signalweg überprüft werden.

Dafür wurden sowohl HEK293T- als auch SW480-Zellen mit einem NFκB-Reportervektor transfiziert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen. Eine relevante Veränderung der Reporteraktivität konnte jedoch weder bei den mit dem MTMR7-CC-Peptid behandelten Zellen, noch bei den MTMR7-überexprimierenden Zellen beobachtet werden (SW480, n=2, n.s. nicht signifikant, Abbildung 13).

**Abbildung 13: SW480 Zellen nach Transfektion mit NFκB-Reportervektor**

SW480-Zellen wurden mit einem NFκB-Reporter-Plasmid transfiziert und entweder mit 1 µM MTMR7-CC-Peptid behandelt oder mit dem FL-MTMR7-Expressionsvektor ko-transfiziert. Als Positivkontrolle dienen LPS-behandelte Zellen. Die Ergebnisse waren nicht signifikant (1Faktor ANOVA) (P1: MTMR7-CC-Peptid, 1 µM, S1: scrambled MTMR7-Peptid, FL: Full-length-MTMR7-Vektor, DMSO1: Dimethylsulfoxid, 1 µM, LPS: Lipopolysaccharid, P1 (PBS): MTMR7-CC-Peptid, gelöst in PBS; 1 µM). Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

Eine Interaktion von MTMR7 in dem NFκB-Signalweg konnte nicht ermittelt werden.

3.4 MTMR7 reduziert die Aktivität des *Serum Response Elements* (SRE)

Das *Serum Response Element* (SRE) wird wie erwähnt durch die RAS-Kaskade stimuliert [20]. Die inhibitorische Wirkung von MTMR7 auf Komponenten der RAS-vermittelten Signalkaskade oberhalb des SREs war bereits bekannt [94]. Daher wurden HEK293T-Zellen mit einem SRE-Reporter-Plasmid transfiziert (Abbildung 14)

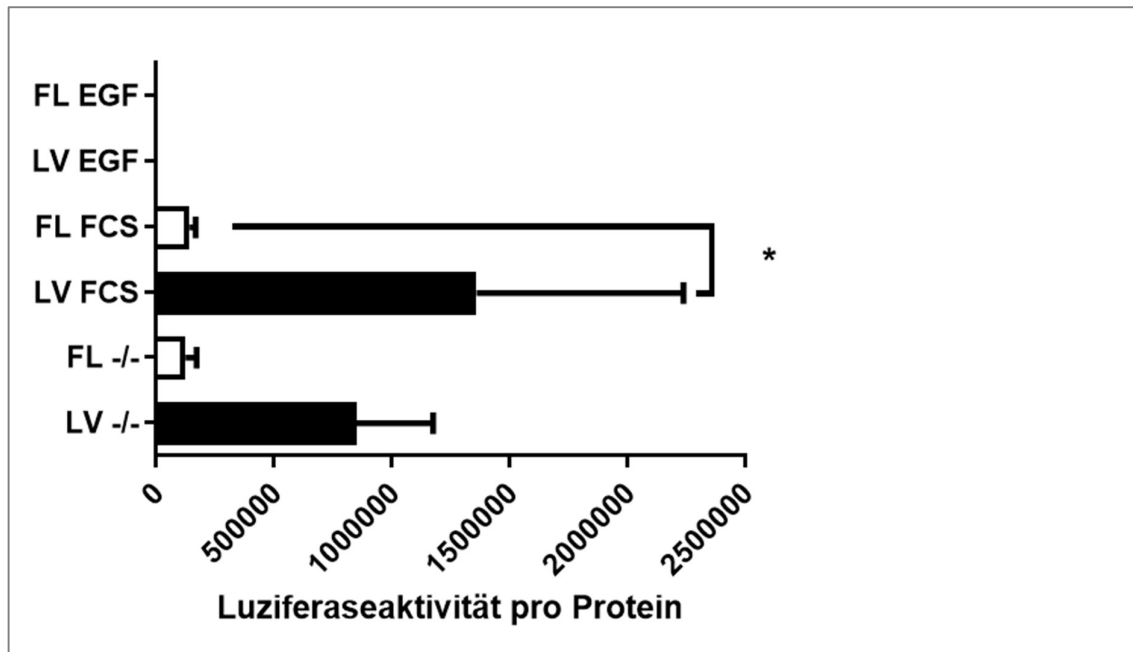


Abbildung 14: MTMR7-FL reduziert die SRE-Aktivität in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit dem SRE-Reportervektor transfiziert und zusätzlich mit dem Leervektor (LV) oder dem MTMR7-FL-Expressionsvektor (FL). Die Zellen wurden entweder für 16 Stunden gehungert in reinem DMEM-Medium, oder stimuliert in einem Gemisch von 80% DMEM und 20% FCS. Außerdem wurden die Zellen mit 1 µg EGF/ml stimuliert. Die Relative Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration genormt. Die MTMR7-FL-transfizierten Zellen wiesen eine geringere Aktivität auf (1Faktor-ANOVA: $P=0,0319$, Subgruppenanalyse: gepaarter t-Test, $n=3$, FL -/- vs. LV -/-: $P=0,0512$, FL FCS vs. LV FCS: $P=0,0216$). Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

Dabei konnte eine signifikant niedrigere Luziferaseaktivität gemessen werden, wenn die SRE-transfizierten Zellen zusätzlich mit dem MTMR7-FL-Vektor transfiziert wurden. Verglichen wurden diese mit dem Leervektor PUC19 [105].

3.5 SRE Aktivität nach PI3K-Inhibition

Da Myotubularine den PIP-Stoffwechsel beeinflussen, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt für die Hemmung der RAS-Signalkaskade durch MTMR7 maßgeblich ist, oder ob dies durch eine andere, bislang ungeklärte Funktionsweise vermittelt wird. Deshalb wurde das oben beschriebene Experiment unter Einsatz des PI3KC3-Inhibitors SAR405 wiederholt.

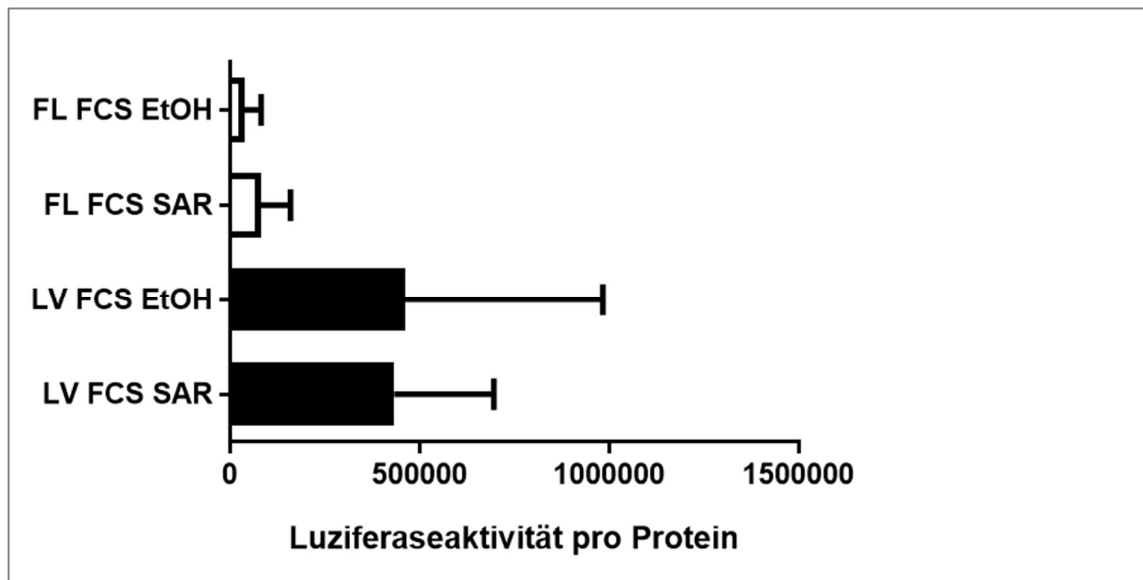


Abbildung 15: SAR405 ohne Effekt auf die SRE-Aktivität in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit dem SRE-Reportervektor transfiziert und zusätzlich mit dem Leervektor (LV) oder dem MTMR7-FL-Expressionsvektor (FL). Das Weiteren wurden sie mit $1\mu\text{M}$ SAR405 behandelt. Der PI3K-Inhibitor SAR405 wurde in Ethanol (EtOH) gelöst. Bei der Auswertung der normalverteilten Daten konnte in der Gruppen-vergleichenden Analyse keine signifikante Veränderung nach Behandlung festgestellt werden (1Faktor-ANOVA, $P=0,077$, 4 Gruppen). In zusätzlich durchgeführten Subgruppenanalysen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit SAR405 behandelten Proben und den mit Ethanol behandelten Kontrollen festgestellt. Hingegen wiesen die mit dem MTMR7-FL transfizierten Behandlungs- und Kontrollgruppen einen starken Korrelationseffekt auf ($n=5$, gepaarter Wilcoxon Test: LV FCS EtOH vs LV FCS SAR; FL FCS EtOH vs FL FCS SAR nicht signifikant; Korrelation nach Pearson: FL FCS EtOH vs FL FCS SAR: $0,8985$ $P=0,0382$). Die relative Luciferaseaktivität entspricht der Luciferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

Abgesehen von dem inhibierenden Effekt durch die MTMR7-FL-Transfektion konnte keine zusätzliche Hemmung durch den PI3KC3-Inhibitor festgestellt werden. Auch bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurde ein inhibierender Effekt durch SAR405 nicht beobachtet, sodass die durch MTMR7 vermittelte Hemmung des SRE offenbar nicht auf eine PI3K-Inhibition zurückzuführen ist.

3.6 Immunhistochemische Auswertung von ERK1/2 im Mausmodell.

Die Inhibition des RAS-Signalweges durch MTMR7 wurde in vorigen Arbeiten bereits dargestellt [94]. Um diesen Einfluss zu verifizieren, wurden die ERK1/2-positiven Zellkerne in einem C57BL6/J Mausmodell des Magenkarzinoms (Stamm: pCEA-SV40-Tag) immunhistochemisch quantifiziert [106]. Zudem wurden die positiv gefärbten Tumorzellen ausgewertet.

Die Hypothese, dass MTMR7 aktives, nukleäres ERK1/2 reduziert, sollte so überprüft werden. Tatsächlich zeigte die Auswertung der Daten Hinweise darauf, allerdings konnte ich bei der geringen Wiederholungszahl der Versuche zwar eine relative Erniedrigung der ERK1/2-Konzentration feststellen, ein signifikantes, quantifizierbares Ergebnis zeigte sich hingegen nicht (Abbildung 16).

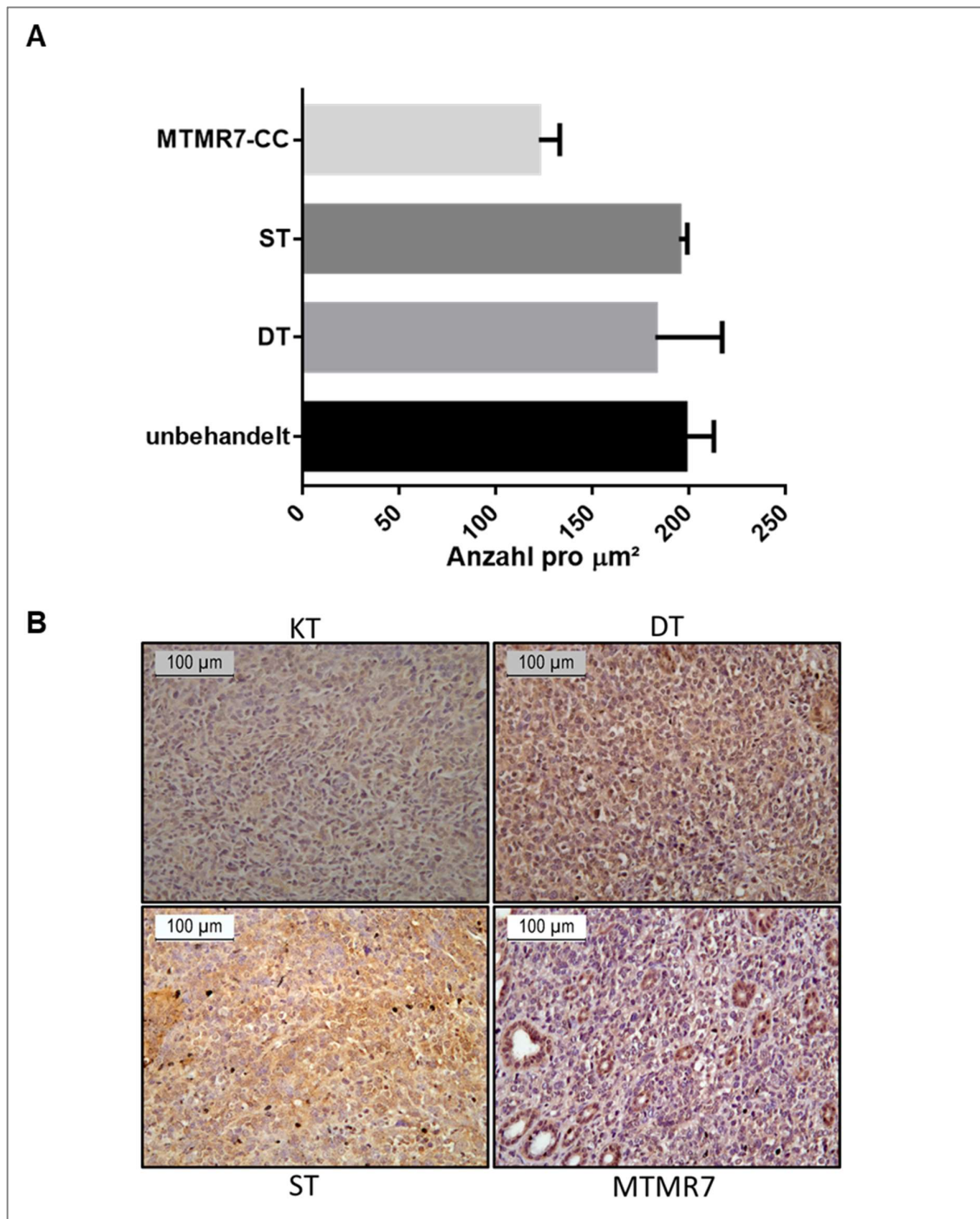


Abbildung 16: Immunhistochemie von ERK1/2 im Mausmodell

Tumor-tragende Tiere wurden in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt, die einerseits unbehandelt blieben, mit DMSO behandelt wurden (DT), mit der MTMR7-Variante (*scrambled*, ST) oder mit dem MTMR7-CC-Peptid mit *Coiled-coil*-Region (MTMR7-CC). Es wurden die Zellen mit positiver nukleärer Färbereaktion für ERK1/2 pro μm^2 gezählt.

16A: ERK 1/2 positive Nuklei

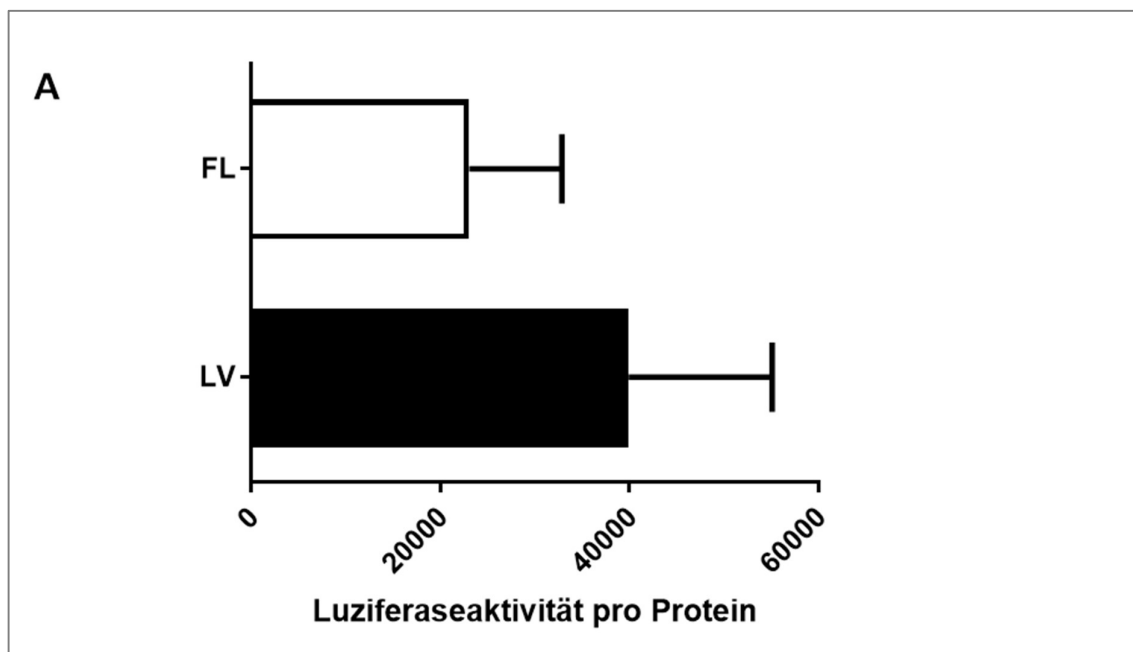
Bei der absoluten Anzahl positiver Kerne pro μm^2 Fläche finden sich weniger positive Kerne bei den mit MTMR7-CC-behandelten Tieren (keine Normalverteilung, Kruskal-Wallis-Test, $n=3$, $P=0,0877$, Mann-Whitney-Test. MTMR7-CC vs. unbehandelt: $P=0,1000$; MTMR7-CC vs. DT: $P=0,2000$; MTMR7 vs. ST: $P=0,1000$).

16B: Repräsentative Bilder der murinen Tumore nach ERK1/2-Färbung

Deutlich wird eine nukleäre ERK1/2 Akkumulation, als Ausdruck für eine aktive ERK1/2-Signalkaskade in den Kontrollgruppen. Dies war in der Therapiegruppe nicht der Fall. Der Maßstab entspricht 100 µm.

3.7 MTMR7 hemmt den WNT-Signalweg

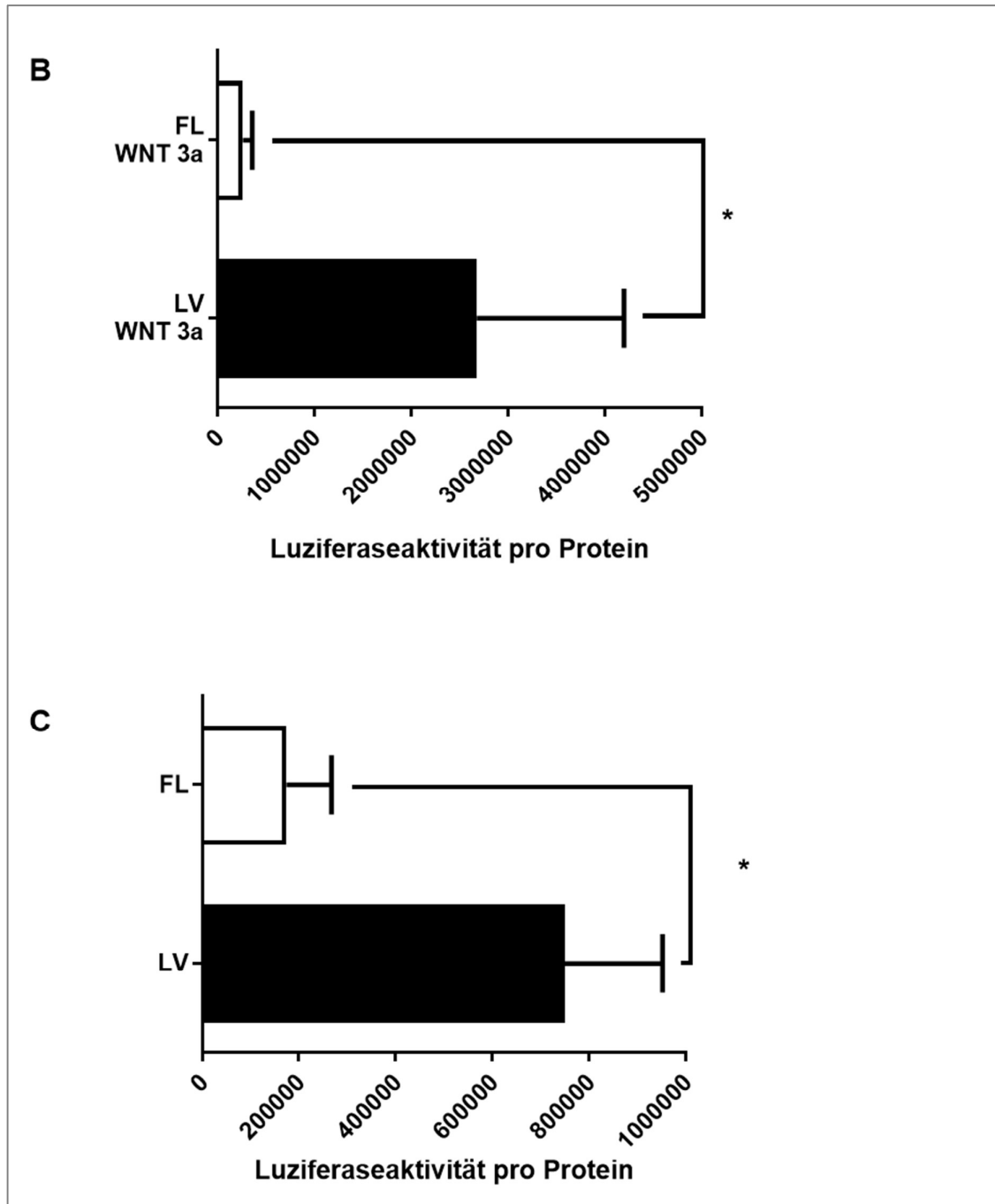
Dass der WNT-Signalweg aufgrund von häufig auftretenden APC-Mutationen in kolorektalen Karzinomen einen zentralen Signalweg darstellt, wurde bereits erläutert [34]. Auf die Verbindung von proliferativen RAS- und WNT- β -Catenin-Kaskaden in der Tumorgenese gastrointestinaler Tumoren wurde dabei Bezug genommen [42, 43]. MTMR7 könnte ebenfalls ein Interaktionspartner des WNT- β -Catenin-Signalweges sein. Daher wurden zunächst HEK293T-Zellen mit einem *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporter transfiziert. Zudem wurden sie mit dem Leervektor PUC19 oder dem MTMR7-FL-Expressionsvektor ko-transfiziert. HEK293T-Zellen sind Modellzellen, die sich besonders gut für die Transfektion eignen. Da sie keine WNT-aktivierende Mutation aufweisen, wurde der Signalweg durch rekombinantes WNT3a aktiviert (Abbildung 17).

**Abbildung 17: TCF/LEF-Promotoraktivität nach MTMR7-FL-Transfektion**

Nach Ko-Transfektion eines *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporters und MTMR7-FL (WNT FL) oder des Leervektors PUC19 (WNT LV) von HEK293T- und SW480-Zellen wurde die Luziferaseaktivität gemessen und auf den Proteingehalt der Proben berechnet. Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

17A: TCF/LEF-Promotoraktivität un behandelter HEK293T-Zellen

Die un behandelten HEK293T-Zellen zeigen sowohl mit als auch ohne MTMR7-Transfektion nur eine geringe Luziferaseaktivität, da diese Zellen keine aktivierende Mutation besitzen.



17B: MTMR7-FL reduziert die TCF/LEF-Promotoraktivität in WNT3a-stimulierten HEK293T-Zellen

Die mit rWNT3a behandelten HEK293T-Zellen zeigen eine erhöhte Luziferaseaktivität, da der WNT-Signalweg aktiviert wird. Die mit MTMR7-FL transfizierten Zellen zeigen eine signifikante Reduktion der Luziferaseaktivität (n=4; Mann Whitney t-Test, FL rWNT3a vs. LV rWNT3a; P=0,0286).

17C: MTMR7-FL reduziert die TCF/LEF-Promotoraktivität in SW480-Zellen

Aufgrund ihrer APC-Mutation weisen SW480 Zellen eine erhöhte basale Aktivität der WNT-abhängigen Signalkaskade auf, was sich in den Experimenten in einer höheren basalen Luziferaseaktivität widerspiegelt. MTMR7-FL reduziert diese hier ebenfalls signifikant (n=6; Normalverteilt nach Kolmogorow-Smirnow-Test; t-Test: FL vs LV; P=0,0274).

Da sowohl in den mit rWNT3a stimulierten HEK293T-Zellen, als auch in den SW480 Zellen das Luziferasesignal durch MTMR7-Überexpression supprimiert war, lässt sich eine Inhibition des überaktivierten WNT- β -Catenin-Signalweges durch MTMR7 vermuten.

Die Versuche mit HEK293T und SW480 Zellen wurden anschließend modifiziert: Nach der Transfektion mit dem *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporter wurden sie mit 0,1; 1 oder 10 μ M MTMR7-CC-Peptid behandelt. Hier zeigte sich ebenfalls eine Inhibition des Luziferasesignals (Abbildung 18).

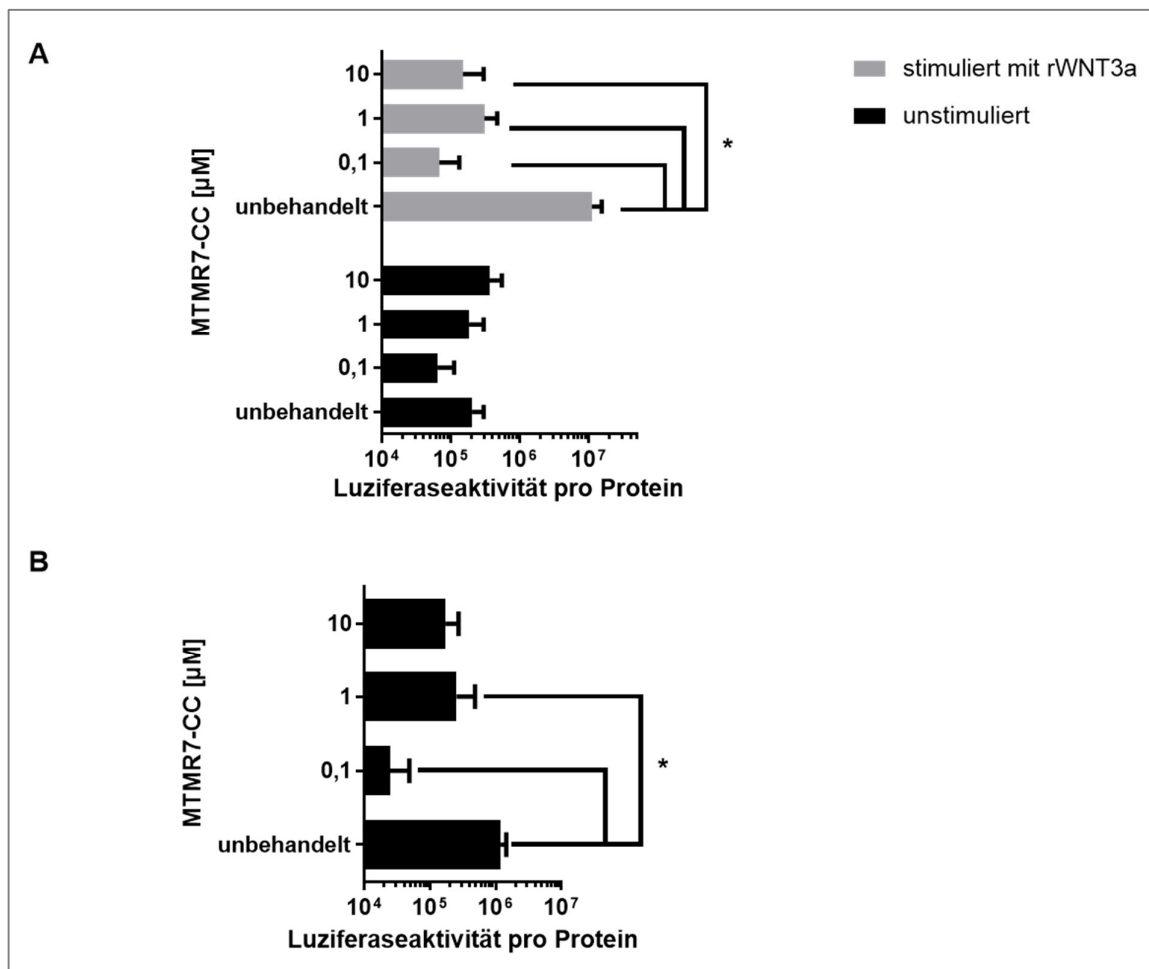


Abbildung 18: TCF/LEF-Promotoraktivität nach MTMR7-CC-Behandlung

HEK293T- und SW480-Zellen wurden mit Topflash-TCF4/ β -Catenin-Reporterplasmid transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des MTMR7-CC-Peptids behandelt (0,1; 1 und 10 μ M für 24h). Anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Die relative Luziferaseaktivität entspricht der Luziferaseaktivität einer Probe bezogen auf ihren Proteingehalt.

18A: MTMR7-CC verringert die TCF/LEF-Promotoraktivität in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit WNT 3a

Um den WNT-Signalweg in HEK293T-Zellen zu aktivieren, wurden diese mit rWNT3a behandelt (stimuliert) oder verblieben unstimuliert. Bei den MTMR7-CC-behandelten Zellen wurde eine Reduktion der Luziferaseaktivität gemessen (Normalverteilung, n=3; 2Faktor-ANOVA, unstimulierte Zellen: keine signifikanten Signalveränderungen, rWNT3a stimuliert Zellen: unbehandelt vs. 0,1: P= 0,0114; unbehandelt vs. 1: P=0,0127; unbehandelt vs. 10: P=0,0118).

18B: MTMR7-CC verringert die TCF/LEF-Promotoraktivität in SW480-Zellen

Die SW480-Zellen wurden mit MTMR7-CC behandelt, eine Stimulation war nicht notwendig, da hier eine konstitutive WNT-Aktivierung vorliegt (s.o.). Die 0,1; und 1 μ Molare Behandlung mit MTMR7-CC-Peptid führte zu einer signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität (n=5; nicht normalverteilt; Friedman-Test, unbehandelt vs. 0,1: Rangsummendifferenz: 10; P= 0,0430; unbehandelt vs. 1: Rangsummendifferenz: 11; P= 0,0212; unbehandelt vs. 10: Rangsummendifferenz: 9; P= 0,0826).

3.7.1 MTMR7-FL verringert den Anteil von aktivem β -Catenin im Zellkern

In APC-mutierten KRK entgeht β -Catenin der proteasomalen Degradation [34, 35]. Aktives β -Catenin gelangt in den Nukleus und aktiviert dort TCF/LEF Transkriptionsfaktoren [107]. Für den Nachweis von aktivem β -Catenin wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt und dabei die zytoplasmatische Fraktion und die Kernfraktion per Gelelektrophorese aufgetrennt. Ziel war es, die Menge von aktivem β -Catenin im Kern der Zellen zu quantifizieren. Die für die Luziferase-Experimente genutzten HEK293T-Zellen, sowie die APC-mutierten SW480-Zellen wurden mit dem MTMR7-FL-Vektor transfiziert. Im Vergleich zu den mit dem Leervektor PUC19-transfizierten SW480-Zellen wurden in der nukleären Fraktion der mit MTMR7-FL transfizierten Zellen eine niedrigere Menge an aktivem β -Catenin nachgewiesen (Abbildung 19). In den HEK293T-Zellen konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

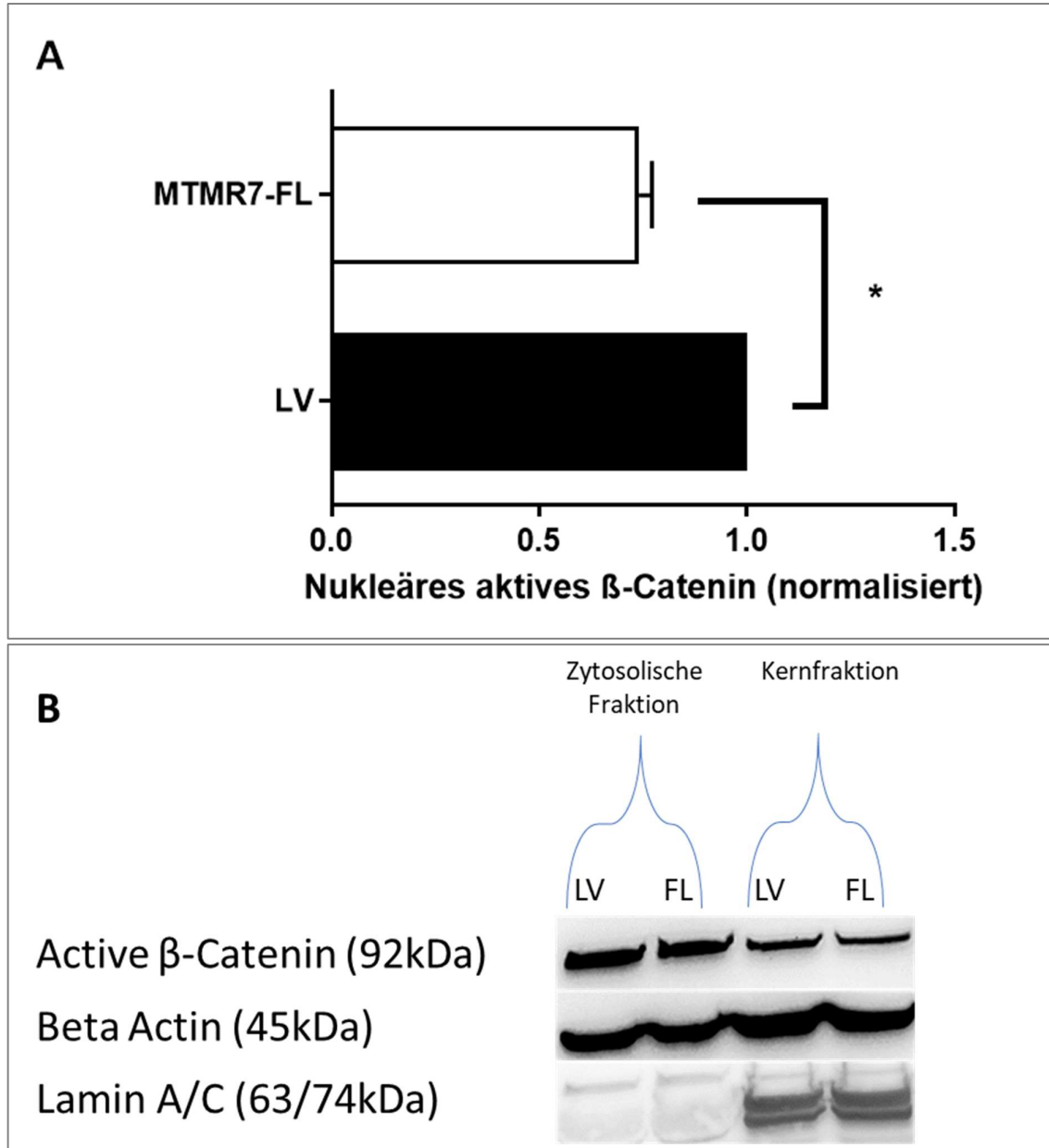


Abbildung 19: MTMR7-FL verringert die nukleäre, aktive β -Catenin-Fraktion
19A: Kernfraktion von SW480 Zellen mit Vergleich von aktivem β -Catenin / Lamin AC normalisiert auf den Leervektor; 19B: representative Western Blots. SW480-Zellen wurden entweder mit dem Leervektor PUC19 transfiziert oder mit MTMR7-FL. Anschließend wurden in den subzellulären Fraktionen die Mengen von nicht-phosphoryliertem, aktivem β -Catenin bestimmt. In der hierfür entscheidenden Kernfraktion wurde ein Abgleich gegen die Kernlamine A und C durchgeführt. Die Quantifizierung der optischen Dichte und Transfektion war mit einer signifikant verringerten Kernfraktion von aktivem β -Catenin bei den mit MTMR7-FL transfizierten Proben assoziiert (n=3; t-Test: P=0,0141).

3.7.2 Immunhistochemie: Nukleäres, aktives β -Catenin im Mausmodell

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob sich die *in vitro* generierten Ergebnisse auf eine MTMR7-CC-basierte *in vivo* Therapie übertragen lassen, erfolgte die immunhistochemische Analyse von nicht phosphoryliertem, d.h. aktivem β -Catenin in dem oben genannten Mausmodell [106] (siehe Abschnitt 3.6). Dabei wurde mithilfe des *active beta Catenin*-Antikörpers der sich in den Kernen befindliche Anteil des β -Catenins in Gewebeschnitten des Magens bestimmt. Hierbei zeigte sich in den mit MTMR7-CC Peptid behandelten Tieren bereits in dieser begrenzten Gruppengröße eine Reduktion der Tumorzellen mit aktivem, nukleärem β -Catenin, verglichen mit der mit dem Kontrollpeptid (*scrambled*) behandelten Gruppe. Im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten Tieren war sich keine Veränderung festzustellen (Abbildung 20).

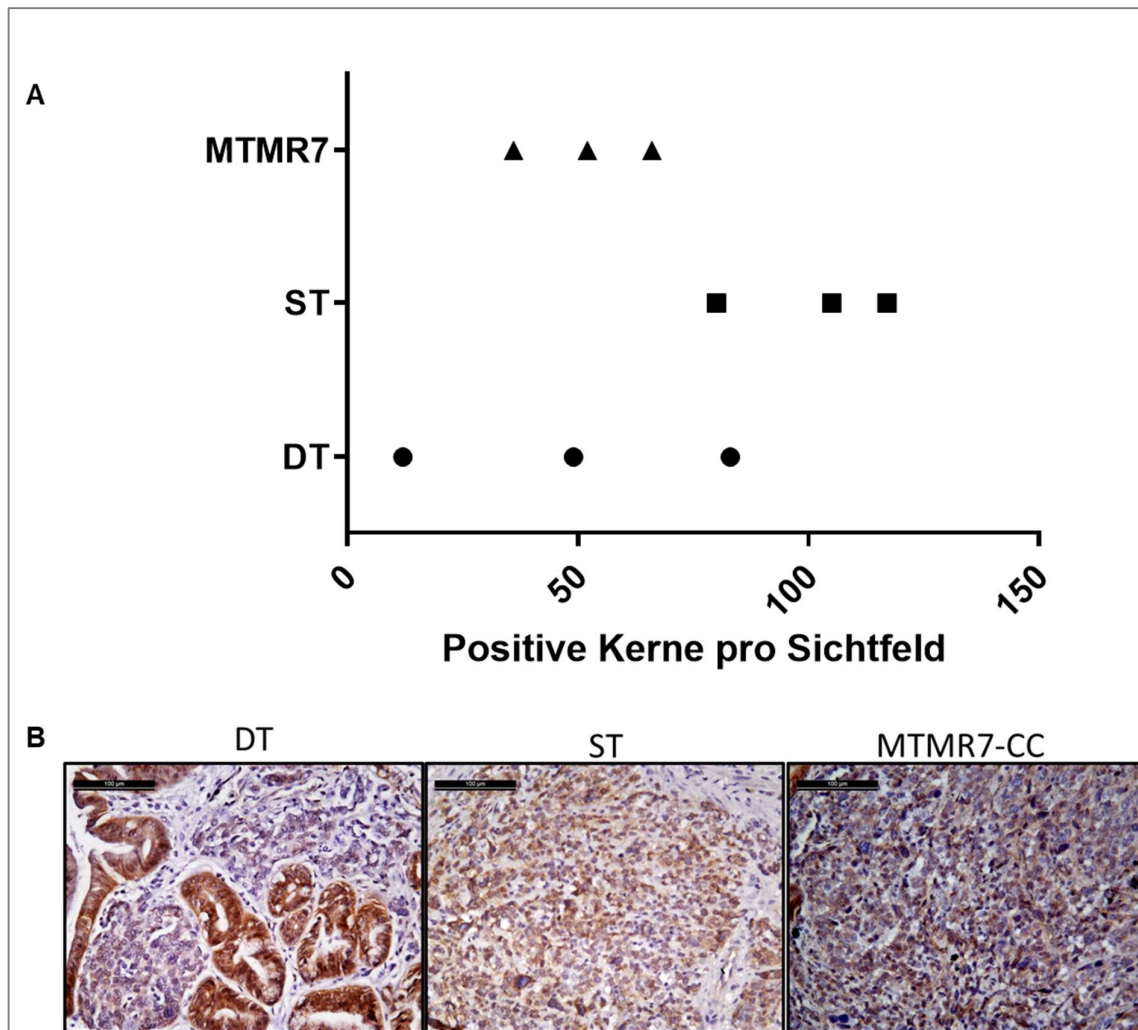


Abbildung 20: Mausmodell: Nukleäres β -Catenin nach MTMR7-CC-Behandlung

20A: Gewebeschnitte der Behandlungsgruppen wurden hinsichtlich ihres nicht phosphorylierten β -Catenins im Kern gefärbt. Dabei wurden die nach einer Färbung mit nukleärem, aktivem β -Catenin positiven Kerne pro Aufnahmegebiet gezählt. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen ($n=3$) konnten keine Normalverteilungen festgestellt werden. Im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Tieren konnte bei den mit MTMR7-CC behandelten Tieren keine signifikante Veränderung der positiven Zellkerne festgestellt werden.

Im Vergleich zu der Behandlungsgruppe mit der veränderten Peptidvariante (*scrambled*, ST) konnte ein Trend für eine Erniedrigung durch MTMR7-CC Peptid beobachtet werden, wiewohl auch hier aufgrund der niedrigen Gruppengrößen keine Signifikanz berechnet werden konnte (MTMR7-CC vs. ST: $P=0,1000$, Mann Whitney Test).

20B: In repräsentativen Bildern ist eine geringere Färbeintensität in Gewebeschnitten der MTMR7-CC-behandelten Tiere nach Färbung gegen aktives β -Catenin im Vergleich zu den mit veränderter Peptidvariante (ST) behandelten Tieren festzustellen. Maßstab $100\mu\text{m}$.

3.8 Immunhistochemische Auswertung des Ki67-Index

Das Ki67-Protein ist ein etablierter Marker für proliferierende Zellen, da es während der G1, S, und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert wird [108-110], in der G0-Phase jedoch nicht detektierbar ist. Um den Einfluss des MTMR7-CC Peptids auf die Proliferation der Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen erfolgte die immunhistochemische Analyse der Ki67 positiven Zellen im oben genannten Mausmodell [106] (Abbildung 21).

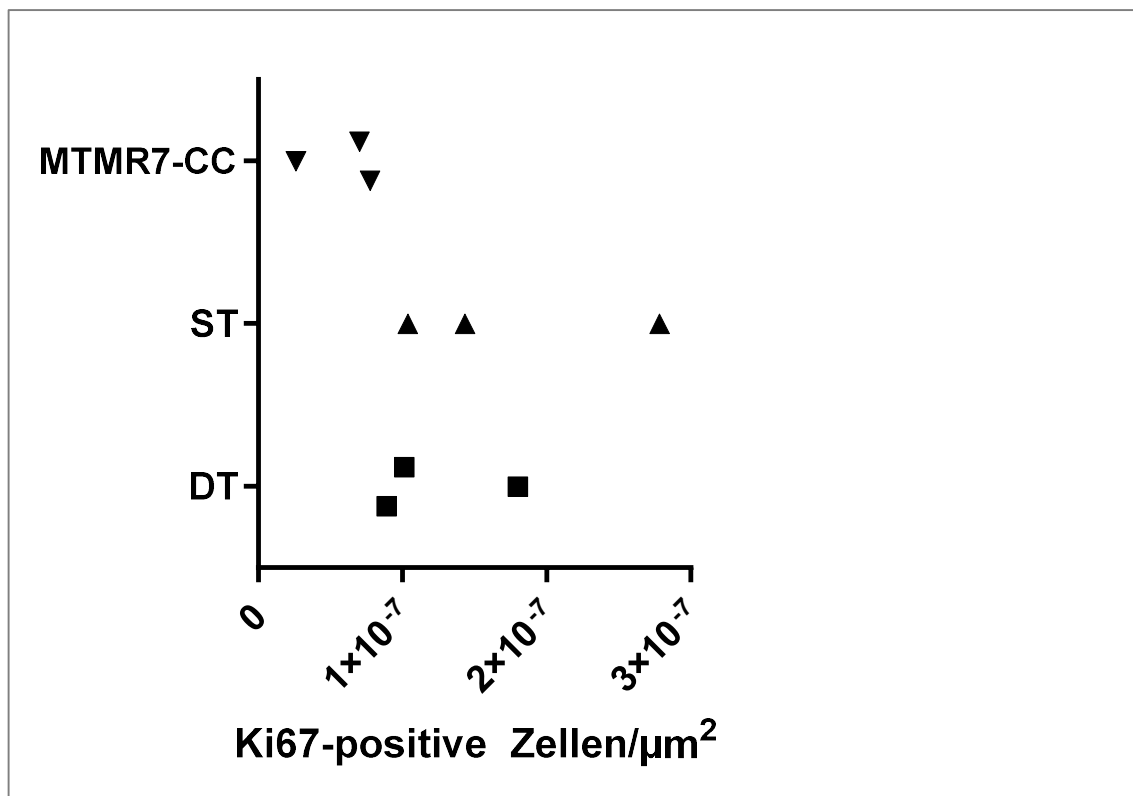


Abbildung 21: Ki67-Index im Mausmodell nach MTMR7-CC-Behandlung

Die bereits beschriebenen verschiedenen Behandlungsgruppen wurden hinsichtlich ihres allgemeinen Ki67-Niveaus getestet. Dafür wurden die Ki67-positiven Zellen pro μm^2 gezählt und als Ki67-Index miteinander verglichen. Aufgrund der niedrigen Gruppengrößen ($n=3$) konnten keine Normalverteilungen festgestellt werden. Angegeben sind die jeweiligen Medianwerte. Es zeigte sich keine signifikante Erniedrigung der mit MTMR7-CC behandelten Tiere, allerdings lässt sich ein Trend für eine verringerte Färbeintensität erkennen ($n=3$, Kruskal-Wallis Test: $P=0,0745$).

Eine generelle Inhibition der Zellproliferation durch MTMR7 lässt sich anhand dieses Experiments erahnen, aufgrund der möglicherweise zu niedrigen Gruppengröße jedoch nicht beweisen.

4 DISKUSSION

4.1 Methodenkritik

Bevor die in Abschnitt 3 beschriebenen Ergebnisse diskutiert werden, sollen die hierfür verwendeten Methoden bewertet werden.

4.1.1 Zellen

Die verwendeten Zellen wurden unter dem Mikroskop mithilfe einer Zählkammer ausgezählt und anhand dessen wurde die Zellzahl pro Volumen errechnet. Bei den dadurch entstandenen Ungenauigkeiten handelt es sich um systematische Fehler, welche statistische Gesamtauswertungen wenig beeinflussen.

4.1.2 Luziferase Reporter Tests

Durch die Messung eines Lichtsignals beim Luziferase Reporter Test wird auf die jeweilige Aktivität des Reporters einer Probe geschlossen. Die absolute Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Probe genormt und mit einer Standardmessreihe verglichen. Dennoch könnte eine nicht-lineare Beziehung des Lichtsignals eines Reporters zum Proteingehalt der Probe die Messergebnisse verfälschen, wenn verschiedene Proben stark unterschiedliche Proteingehalte aufweisen. Der Proteingehalt der Proben wurde durch die vorher durchgeführten Zellzählung (s.o.) angeglichen, die dennoch unterschiedlichen Proteinmengen einzelner Proben wurden bei der Auswertung in Bezug zu der jeweiligen Signalintensität gesetzt. So wurde die „relative Luziferaseaktivität“ beschrieben, die die Luziferaseaktivität pro Proteingehalt der jeweiligen Probe angibt. Eine potenzielle Autophosphorylierung von Proben, die nicht durch die Reporteraktivität zustande kommen, verfälschen das Ergebnis beträchtlich. Daher wurden die jeweiligen Reporter und Behandlungsstoffe einmal unabhängig von den Experimenten auf verfälschende Lichtsignale getestet.

4.1.3 Western Blot

Die Messung der Intensität der Banden wurde als Fläche einer AUC manuell mithilfe des Programms Image J durchgeführt und unterliegt daher einer gewissen Fehlerquote. Durch den Abgleich von untersuchten Proteinen mit ubiquitär exprimierten und wahrscheinlich nicht durch Stimulation beeinflussten Proteinen konnte eine möglicherweise, trotz vorheriger Berechnung, nicht gleiche Probenmenge mit den entsprechenden Proteinen abgeglichen werden und somit die verschiedenen Proben - im Rahmen der Fehleranfälligkeit der Methode (s.o.) – verglichen werden.

4.1.4 Anzahl der Wiederholungen

Die immunhistochemischen Auswertungen der ERK1/2, der aktiven β -Catenin sowie der Ki67 Antikörper basierten Färbungen lassen keine quantifizierbare Aussage über eine signifikante Veränderung in den Tieren zu, die mit dem MTMR7-CC-Peptid behandelt wurden und mit den Kontrollgruppen zu vergleichen sind. Dies ist zunächst darauf zurückzuführen, dass nicht genügend Proben untersucht wurden, um ein statistisch signifikantes Ergebnis aufzuzeigen.

Um die möglichen Trends quantifizieren zu können, muss eine umfangreichere Datenreihe ausgewertet werden.

4.1.5 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung der Daten wurden diese zunächst mithilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus Normalverteilungs-Tests und des Shapiro-Wilk Normalverteilungs-Tests auf eine Normalverteilung getestet. Auch der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde dafür genutzt. Sofern keine Normalverteilung vorlag, wurde zum Beispiel der Wilcoxon-Test verwendet. Teilweise konnte ich bei Experimenten mit der geringen Stichprobengröße von $n=3-6$ eine Normalverteilung feststellen und habe daher t-Tests angewandt. Hierbei wird in der Literatur jedoch eine Mindestgröße von $n \geq 10$ für die Auswertung angenommen [111]. Andererseits können auch bei kleineren Stichproben die Kriterien der Normalverteilung nach vorheriger Testung erfüllt werden. Zudem sind die Daten jeder einzelnen Probe auf das Zusammenwirken von circa 750000 Zellen zurückzuführen, welche untereinander verschieden auf Stimulation, Transfektion oder Behandlung reagieren und insgesamt als eine Bandbreite von Einzelexperimenten angesehen werden können. Zwar lassen sich die Zellen nicht einzeln untersuchen, aber anhand dieser Überlegungen erscheinen die durchgeführten statistischen Tests akzeptabel.

4.1.6 Lösungsmittelkontrollen bei *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reportertests

Eine Herausforderung stellten Effekte des als Lösungsmittel genutzten DMSOs dar. Sowohl in den Luziferaseexperimenten, in denen der WNT- β -Catenin-Signalweg untersucht wurde, als auch in der immunhistochemischen Auswertung schwächte DMSO das WNT-Signal ab, wobei es denkbar wäre, dass DMSO entweder eine generell toxische Wirkung auf die Tumorzellen hat oder tatsächlich eine partiell antagonistische Rolle in dem WNT-Signalweg einnimmt. Letzteres ist vermutlich unwahrscheinlich, da DMSO ein weithin akzeptiertes und häufig verwendetes Lösungsmittel in der biologischen Forschung darstellt, wenngleich einige generelle immunmodulatorische Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration teilweise beschrieben werden [112, 113]. Es zeigte sich jedoch, dass das MTMR7-CC-Peptid auch in PBS (pH 7,4) gelöst werden kann. PBS *per se* zeigte keine Effekte auf die Reporteraktivität, sodass es bei den WNT-transfizierten Zellen als Lösungsmittel verwendet wurde.

4.2 Modell der MTMR7-KRAS-Interaktion

Diese Arbeit befasste sich zum großen Teil mit RAS-assoziierten Signalwegen, da die Inhibition dieser Kinasekaskade bereits in vorherigen Experimenten untersucht wurde [83, 94, 98]. Die Hemmung der durch EGF-aktivierten Signalwege über PI3K-AKT und RAS-MEK1/2-ERK1/2 konnte darin dargestellt werden: MTMR7-FL-transfizierte kolorektale Tumorzellen und HEK293T-Zellen wiesen einen geringeren Phosphorylierungsgrad von AKT auf, wobei sowohl der Thr308-Rest, welcher Ziel der oberhalb verschalteten PI3K-abhängigen Signalkaskade ist, ein geringeres Phosphorylierungsniveau aufwies, als auch der Ser473-Rest, durch dessen Phosphorylierung die Aktivierung von mTORC2 vermittelt wird [94]. Zudem wurde eine Verringerung der durch MEK1/2 vermittelten Phosphorylierung von ERK1/2 (p42/p44) festgestellt [94] [98, 99].

Die Experimente, bei denen die Luziferase-Aktivität des *Serum Response Elements* aus dem *cFOS* Promotor bestimmt wurden, sollten die Hemmung der RAS assoziierten Signalkaskade auf genomischer Ebene beschreiben. Es zeigte sich eine deutliche Inhibition bei den mit MTMR7-FL-transfizierten Proben. Die Hemmung des SRE-Reporters nach MTMR7 Überexpression deutet dabei auf einen inhibitorischen Effekt auf der Ebene der Zielgene der RAS-vermittelten Signalkaskade hin.

Dabei ist hervorzuheben, dass ein Ergebnis mit RAS-mutierten Zelllinien, wie der KRK-Zelllinie SW480, welche eine *KRASG12V*-Mutation aufweist, aufschlussreich gewesen wäre. Die SW480-Zellen ließen sich jedoch nicht erfolgreich mit dem SRE-Reporter transfizieren. Auf der anderen Seite konnten sich die *in vitro* generierten Ergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen. Die verminderte nukleäre Lokalisation von ERK1/2 in der immunhistochemischen Analyse der Färbung der Magengewebe aus C57BL/6/J Mäusen (pCEA-SV40-Tag) deutet auf eine Hemmung der oben genannten Signalkaskade durch MTMR7-CC *in vivo* hin.

4.2.1 Mechanismen der KRAS-Inhibition durch MTMR7

Inhibitoren von MEK1/2 oder BRAF, die bei *KRAS*-Mutationen eingesetzt werden, aktivieren durch eine Rückkopplungswirkung die PI3K-abhängigen Abschnitte der EGF-vermittelten Signalkaskade, genauso wie den WNT- β -Catenin-Signalweg [44]. Daraus resultiert eine sekundäre Resistenz gegenüber den primär wirksamen Therapien. Dies stellt weiterhin ein Problem in der klinischen Praxis dar.

Neben der durch Guanosinaustauschfaktoren vermittelten Wirkung, zum Beispiel die Phosphorylierung von GDP zu GTP, welches dann durch das monomere G-Protein RAS umgesetzt wird, spielen elektrophile Wechselwirkungen in der Aktivierung von RAS eine Rolle. So bindet K-RAS besonders an negativ geladene PtlnsP-reiche Membranen, so wie sie in intrazellulären Vesikeln vorhanden sind [114-116].

MTMR7 ist in der Nähe seiner Substrate an endosomalen Membranen lokalisiert, wo auch der RAS-Signalweg abläuft. Ein Zusammenspiel scheint aufgrund einer Interaktion im membranären Kompartiment möglich, an dem RAS mit SOS oder der PI3K interagiert.

MTMR7 besitzt mit seiner für Heterodimerisierung zuständigen *Coiled-Coil*-Domäne eine Glutamat-reiche Proteindomäne [99], welche aufgrund ihrer negativen Ladungen eine Assoziation zu positiv geladenen polybasischen Arginin- und Lysin-reichen K-RAS-Domänen haben könnte. Diese Domänen befinden sich in der C-terminalen hypervariablen Region von K-RAS¹, welche die Interaktion des post-translational modifizierten K-RAS mit intrazellulären Membranen vermittelt [114]. Eine durch MTMR7 vermittelte Dephosphorylierung zytoplasmatischer PtlnsP, die als direkte Konsequenz die Hemmung von Ptlns-abhängigen Kinasen wie RAS zu Folge hat, erscheint generell möglich, allerdings ist zu beachten, dass der zytoplasmatische Gehalt an PtlnsP sehr gering ist [114]. Die in Voruntersuchungen festgestellte Dephosphorylierung von Ptlns(3)P und Ptlns(3,5)P₂ [98] gilt es jedoch ebenfalls als regulierendes Element zu beachten. Eine direkte Interaktion mit onkogenem K-RAS erscheint jedoch aufgrund der breiten Hemmung der verschiedenen zentralen Signalkaskaden (RAS-ERK1/2, RAS-AKT, WNT- β -Catenin) wahrscheinlicher.

¹ NRAS und HRAS besitzen C-terminal ebenfalls hypervariable Regionen, die jedoch einer etwas anderen post-translationalen Modifikation unterliegen [108].

Um erste Hinweise zu generieren, ob es sich bei den MTMR7-vermittelten Effekten mit Bezug auf die RAS-Inhibition um solche handelt, die entweder durch die enzymatische Aktivität der Phosphatase hervorgerufen werden oder auf Protein-Protein-Interaktionen beruhen, wurde die Wirkung MTMR7-Überexpression im Kontext einer PI3KC3-Inhibition untersucht. Dabei wurde der PI3K-Inhibitor SAR405 eingesetzt, in dessen eingesetzter Wirkstoffkonzentration eine Supprimierung des Substratpools von MTMR7 zu erwarten ist.

Dabei wiesen die mit MTMR7-FL transfizierten Proben und mit SAR405 behandelten Proben gleichbleibende Luziferaseaktivitäten auf. Zudem zeigte sich bei den mit dem Leervektor ko-transfizierten Proben ebenfalls keine Reduktion der SRE-Luziferaseaktivität durch SAR405-Behandlung. Dies spricht nicht nur gegen einen synergistischen Effekt in der Hemmung von RAS durch die zusätzliche Hemmung der PI3KC3, sondern generell gegen einen RAS-inhibierenden Effekt durch PI3K-Inhibition. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die antiproliferative Wirkung von MTMR7 folglich nicht auf dessen PI3KC3-Inhibition zurückzuführen zu sein.

Die zentrale Wirkung des MTMR7 hängt daher wahrscheinlich mit seiner *Coiled-Coil*-Domäne zusammen, die durch Dimerisierung Proteine, wie MTMR9 und PPAR γ [99] verstärkt und mögliche andere, wie RAS inhibieren könnte (Abb. 23).

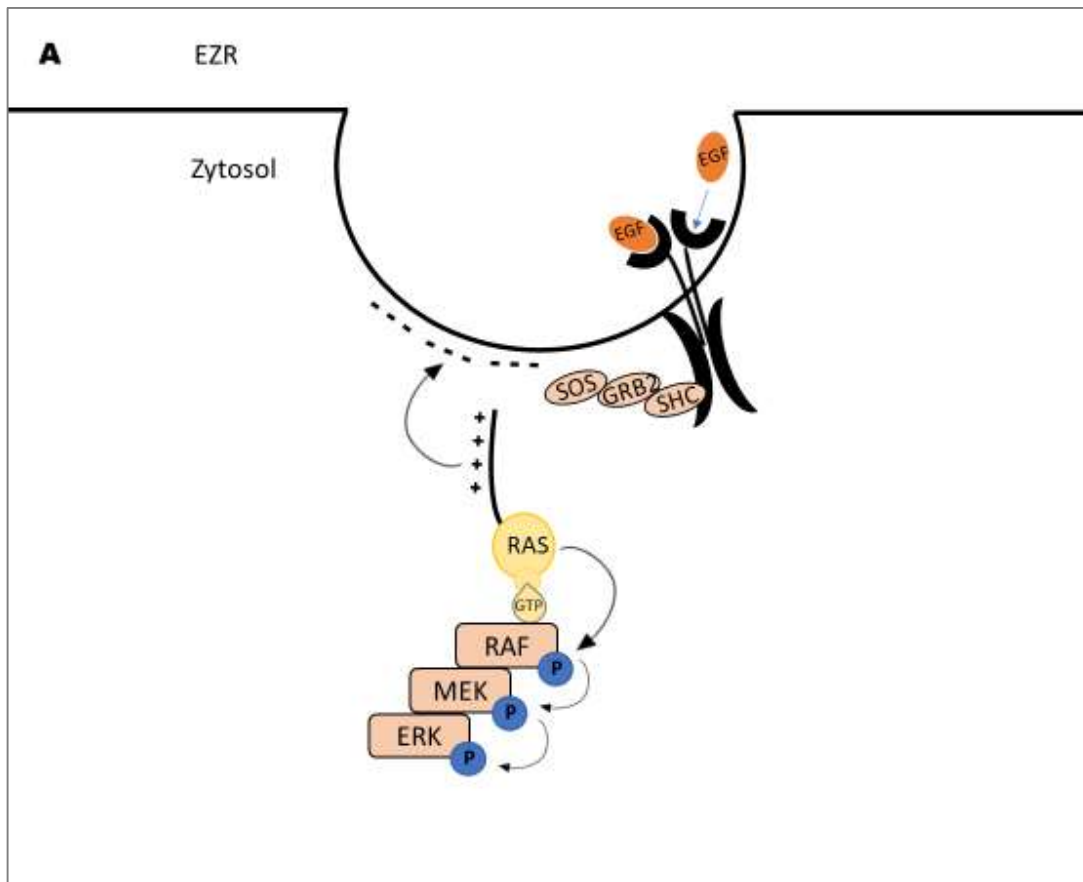


Abbildung 22: Ablauf der RAS-Signalkaskade an intrazellulären Vesikeln

EGF-Rezeptoren werden durch Endozytose internalisiert. KRAS-Proteine binden mit ihren C-terminalen positiv geladenen Domänen an vornehmlich negativ geladene Membranen, die reich an Phosphatidyl-Serinresten und PtlinsP sind [114, 116].

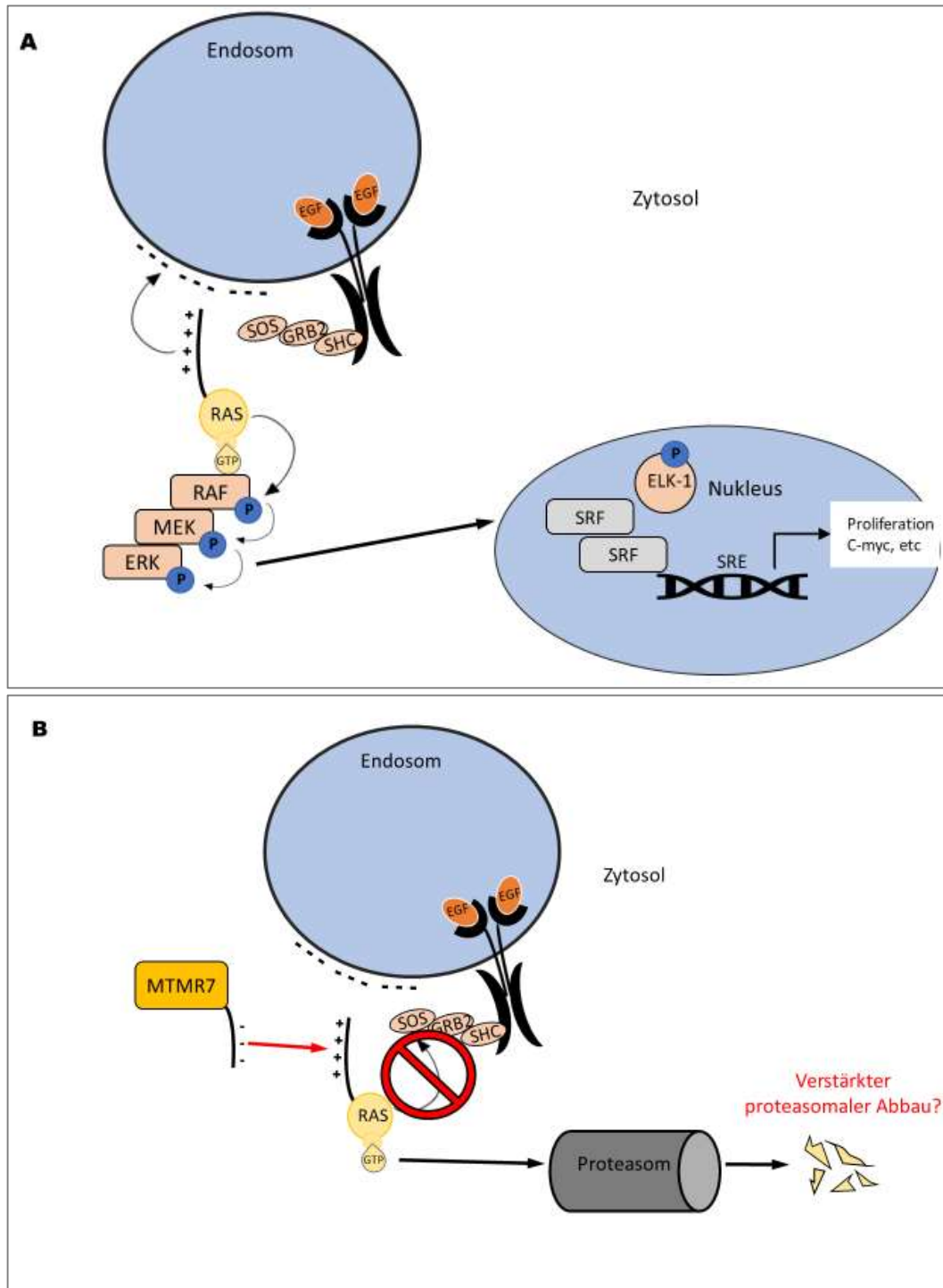


Abbildung 23: Modell: MTMR7-vermittelte KRAS-Interaktion und Inhibition

23A: Durch Endozytose gelangen die aktivierten Rezeptoren in intrazelluläre Vesikel, u.a. Endosomen. Sofern die RAS-Signalkaskade nicht inhibiert wird, folgt die bereits erläuterte Aktivierung des SRE [20]. Die Überexpression proliferativer Zielgene ist die Folge [17, 114].

23B: Die an Glutamat reiche, vornehmlich negativ geladene *Coiled-Coil*-Domäne von MTMR7 ist die Region, über welche eine Heterodimerisierung entsteht [75]. Eine Interaktion mit der positiv geladenen K-RAS-Domäne ist möglich. Durch einen eventuellen proteasomalen Abbau von K-RAS lässt sich die nachhaltige Hemmung des Signalweges ohne negative Rückkopplung auf die PI3K- oder WNT-Signalwege erklären und skizziert die mögliche Funktion von MTMR7.

Die exakte Funktion von MTMR7 in der RAS- Signalkaskade sollte für die Überprüfung dieser Hypothese genauer untersucht und die Lokalisation des MTMR7-Proteins an intrazellulären Vesikeln genauer beschrieben werden. Ein weiterer wichtiger experimenteller Schritt wäre der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion zwischen MTMR7 und KRAS.

Die anfangs erwähnte Problematik der sekundären Resistenz von MEK1/2- und BRAF-Inhibitoren durch Rückkopplungs-Aktivierung des PI3K-abhängigen Abschnittes der EGF-vermittelten Signalkaskade sowie des WNT- β -Catenin-Signalweges [44] könnte möglicherweise durch die Gabe eines MTMR7-ähnlichen Stoffes (e.g. Peptidomimetikum) umgangen werden.

Eine genauere Untersuchung einer möglichen MTMR7-KRAS-Interaktion ist daher erstrebenswert.

4.3 MTMR7-Lokalisation und Auswirkung auf zentrale Signalkaskaden

Die Ergebnisse sprechen für eine nachhaltige Hemmung der RAS-Kaskade und des WNT- β -Catenin-Signalweges durch MTMR7. Dass MTMR7, im Gegensatz zu anderen Inhibitoren der RAS-abhängigen Signalkaskade, keine kompensatorische Verstärkung des WNT-Signals auf nukleärer Ebene bewirkt [44], könnte mit einer direkten Interaktion zwischen MTMR7 und K-RAS zusammenhängen (s.o.).

Zwar hat MTMR7 die für die Gruppe der Myotubularine besondere Eigenschaft, dass es auch im Zytosol lokalisiert sein kann, allerdings findet die Signaltransduktion von K-RAS an intrazellulären Vesikeln, wie Endosomen statt [116]. Falls MTMR7 das K-RAS nach der oben beschriebenen Hypothese aufgrund einer direkten Interaktion hemmt, dann wäre der Hauptort seiner Lokalisation in dem intrazellulären Vesikelnetzwerk.

In einer Arbeit [77] wurde MTMR9, der inaktive Bindepartner von MTMR7, vor allem an Vesikeln des Golgi-Netzwerkes lokalisiert. Ein MTMR9-*knock-out* führte zu einem verlangsamten WNT3a-Transport in den Vesikeln von dem Endoplasmatischen Retikulum hin zu dem Golgi-Apparat [77]. In der genannten Studie wurden neben dem inaktiven MTMR9 auch seine aktiven Bindepartner MTMR6 und MTMR8 untersucht, nicht jedoch MTMR7. Die oben diskutierte Hypothese der Lokalisation von MTMR7 an intrazellulären Vesikeln generell, möglicherweise Endosomen, passt zu der Erörterung, wieso MTMR7 sowohl die RAS-Kaskade, als auch den WNT- β -Catenin-Signalweg inhibiert. In Analogie zu den Erkenntnissen über die Funktion und Lokalisation von MTMR9, ist die Lokalisation von MTMR7 an Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums, bzw. des Golgi-Netzwerkes möglich.

4.4 Inhibition des WNT- β -Catenin-Signalweges durch MTMR7

MTMR7 konnte den WNT Signalweg hemmen. Auf welche Weise diese Inhibition erfolgt bleibt zu klären, muss in weiterführenden Experimenten evaluiert werden. Die Inhibition wurde zunächst durch eine verringerte Luziferaseaktivität des *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporters gezeigt. Zudem wurde ein geringerer Proteingehalt von nukleärem β -Catenin nach MTMR7-FL-Überexpression gemessen. Die

immunhistochemische Untersuchung des Mausmodells weist ebenfalls auf einen geringeren nukleären Gehalt von β -Catenin hin, ließ sich aufgrund der niedrigen Gruppengröße jedoch nicht statistisch validieren.

Bei der Diskussion von potenziellen Wegen der WNT-Inhibition gilt es zu beachten, dass in den dargestellten Versuchen eine Inhibition in APC-mutierten Zellsystemen gezeigt wurde. Dies schließt physiologische Arten der WNT-Inhibition, deren molekulares Ziel oberhalb des β -Catenin-Zerstörungskomplexes liegt und oft auf der genomische Aktivierung von WNT-Antagonisten basiert, aus.

Die Art der Hemmung muss daher genauer untersucht werden. Folgend sollen eine mögliche Rolle von PPAR γ sowie eine Hemmung des Signalweges aufgrund der Funktion von MTMR7 im Vesikeltransport in die Diskussion miteinbezogen werden.

4.4.1 Modell einer MTMR7 und PPAR γ -induzierten Inhibition β -Catenins

MTMR7 aktiviert PPAR γ durch die Inhibition der MEK1/2-ERK1/2 Kaskade, was zu einer geringeren Konzentration von phosphorylierten PPAR γ führt. Zudem ist MTMR7 durch eine Protein-Protein-Interaktion mit PPAR γ ein direkter Ko-Aktivator des Kernrezeptors [98]. Durch einen niedrigeren Phosphorylierungsgrad von MEK1/2-ERK1/2 wird die transkriptionelle Aktivität des PPAR γ gefördert [48, 52, 117].

Es wurden eingangs die sich gegenseitig antagonisierenden Wirkungen des WNT- β -Catenin-Signalweges und des Kernrezeptors PPAR γ beschrieben: PPAR γ -Agonisten verringern den Anteil von zytoplasmatischen β -Catenin [56]. Dieser Abbau findet über die PPAR γ -vermittelte Aktivierung von APC statt, woraus eine proteasomale Degradation β -Catenins folgt. MTMR7 verstärkt die genomische Aktivität des Kernrezeptors, was zunächst einmal dafürsprechen könnte, dass eine Hemmung der durch WNT-Liganden aktivierte Signalkaskade in nicht mutierten Zellen auf transkriptioneller Ebene stattfindet. In Luziferase-Experimenten mit nicht APC-mutierten HEK293T-Zellen wurde eine durch WNT3a-stimulierbare verstärkte Promoteraktivität sowohl durch die Ko-Transfektion von MTMR7-FL als auch durch die Behandlung mit dem MTMR7-CC-Peptid unterdrückt. Dieser Effekt konnte auf der Ebene der Proteindetektion von nukleärem, aktiven β -Catenin jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Experimente in dem APC-mutierten Zellsystem SW480 zeigten bei den Luziferase-Versuchen eine hohe Basalaktivität des Reporters. Nach Behandlung mit dem MTMR7-CC-Peptid oder nach Ko-Transfektion mit MTMR7-FL konnte man eine deutliche Hemmung des Luziferase-Signals feststellen. In diesen Zellen zeigte sich ebenfalls eine signifikant reduzierte nukleäre Fraktion aktiven β -Catenins nach Ko-Transfektion mit MTMR7-FL.

Der erwähnte Antagonismus von PPAR γ und WNT- β -Catenin, wie sie bei verschiedenen Stoffwechsel-assoziierten Erkrankungen, aber auch Tumorerkrankungen beschrieben ist, bezieht sich unter anderem auf eine verminderte PPAR γ -Aktivität bei onkogen veränderten WNT-Signalwegen [118, 119]. Die Hemmung des WNT-Signalweges durch verstärkte genomische PPAR γ -Aktivität beruht jedoch auf der genetischen Intaktheit des Signalweges. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigen eine WNT-Inhibition auch bei dem Vorliegen einer APC-Mutation. Es ist bekannt, dass PPAR γ -Agonisten eine Verminderung des zytoplasmatischen β -Catenins durch die Aktivierung der GSK3 β vermitteln [51].

APC befindet sich im Signalweg jedoch nach der GSK3 β und verhindert dadurch den Abbau β -Catenins. MTMR7 verstärkt zwar die genomische PPAR γ -Aktivität, allerdings lässt sich folglich nicht die WNT-Inhibition in APC-mutierten, kolorektalen Zellsystemen erklären.

Neben der genomisch induzierten WNT-Inhibition durch PPAR γ ist jedoch noch eine weitere Form der Hemmung beschrieben [56]: Liu et al. stellten auch eine post-translationale Art der Inhibition fest. Dabei zeigte sich, dass β -Catenin und PPAR γ miteinander interagieren und die nukleäre Bindung an die Effektorproteine TCF/LEF supprimiert wird [57]. Hier wurde eine Protein-Protein-Interaktion von PPAR γ und β -Catenin identifiziert. PPAR γ besitzt eine sogenannte Cateninbindedomäne (CBD). Die CBD ist eine Region im PPAR γ -Protein in den Helices 7 und 8 [120]. Sie bindet an der Region im β -Catenin-Protein an, die ansonsten eine Assoziation mit TCF/LEF-eingeht. Durch diese kompetitive Hemmung könnte eine Aktivierung proliferativer Zielgene wie z.B. *c-MYC* verhindert werden. Eine solche Interaktion kann auch in onkogen veränderten WNT-Signalwegen auftreten, solange die für die PPAR γ -Interaktion wichtigen Lysinreste Lys312 und Lys435 im β -Catenin vorhanden sind. Bei entsprechenden S37A-Mutationen, die β -Catenin betreffen, ist dies nicht der Fall. Da die SW480-Zellen jedoch eine Kolonkarzinomzelllinie repräsentieren, die eine klassische *APC*-Mutation aufweist und keine der seltenen *β -Catenin*-Mutationen, lässt sich ein post-translationaler Inhibitionsmechanismus zunächst diskutieren. MTMR7 interagiert mit PPAR γ auf Proteinebene. Eine Bindung des Kernrezeptors an β -Catenin mit der Folge von dessen proteasomalen Degradation ist jedoch nur dann möglich, wenn MTMR7 nicht selbst an die Helices 7 und 8 PPAR γ bindet. Die sterische und stöchiometrische Komplexbildung bleibt zu klären.

Dass diese Form der Hemmung auch durch herkömmliche PPAR γ -Agonisten, wie Rosiglitazone gefördert wird, ist unwahrscheinlich, da für solche bekannt ist, dass sie als Nebeneffekt den RAS-Signalweg stimulieren können [120]. Die Überaktivierung des RAS-Signalweges kann jedoch über einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus die Anreicherung β -Catenins fördern [42], was wiederum dessen Abbau durch direkte Proteininteraktion entgegenwirken könnte. So wurde in *APC*-deletierten Mäusen die Tumorgenese von KRK nach Behandlung mit den eher unspezifisch wirksamen Thiazolidinonen erkannt [121, 122]. MTMR7 dagegen inhibiert ebenso die RAS-Kaskade, wodurch die Anreicherung β -Catenins durch diese unwahrscheinlich ist.

Eine Hemmung β -Catenins durch PPAR γ -Ko-Aktivierung ist theoretisch möglich, andere Mechanismen sollten jedoch zunächst untersucht und folgend diskutiert werden.

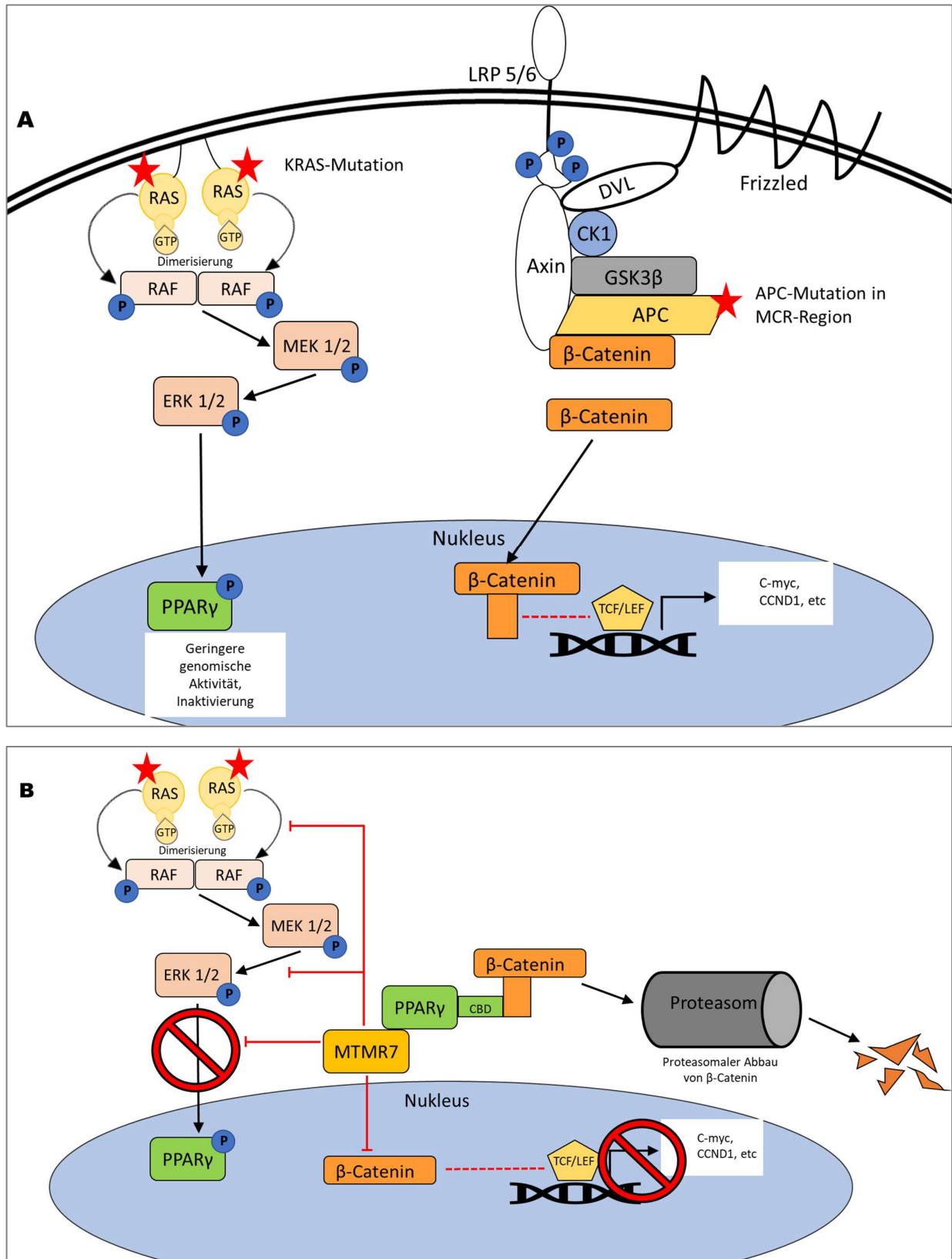


Abbildung 24: Modelle der MTMR7-PPAR γ - β -Catenin-Interaktion in KRK

24A: In Kolonkarzinomen, welche aktivierende *KRAS*- und *APC*-Mutationen aufweisen, phosphoryliert ERK1/2 den PPAR γ am Ser84-Rest. Dadurch wird PPAR γ inaktiviert [48]. Zudem wird die genomische Funktion des Kernrezeptors supprimiert.

Durch APC-Mutationen in der MCR-Region entgeht β -Catenin dem proteasomalen Abbau, akkumuliert, gelangt in den Nukleus und aktiviert dort die TCF/LEF. Dadurch werden proliferative Signalgene überaktiviert.

24B: MTMR7 hemmt den durch KRAS-Mutationen oder exogen durch EGF aktivierten RAS-Signalweg. PPAR γ entgeht dadurch einerseits der Phosphorylierung, was zu seiner verstärkten genomischen Funktion führen könnte. Dadurch kann in nicht-mutierten Zellen die WNT-Aktivität gehemmt werden. In APC-mutierten KRK-Zellen lässt sich eine WNT-Inhibition durch die verstärkte genomische PPAR γ -Wirkung jedoch nicht erklären. Die Hypothese einer PPAR γ -abhängigen β -Catenin-Hemmung in APC-mutierten KRK basiert hingegen auf einer direkten Interaktion als Bindungspartner. Diese Bindung kann über die Cateninbindedomäne (CBD) stattfinden, eine Region im PPAR γ -Protein in den Helices 7 und 8 [57]. Sie bindet an der Region im β -Catenin-Protein an, die ansonsten eine Assoziation mit TCF/LEF-eingeht. Dadurch könnte es zu einer kompetitiven Hemmung kommen, welche eine Aktivierung proliferativer Zielgene wie z.B. *c-MYC* verhindern würde. MTMR7 ist ebenfalls ein Bindepartner des PPAR γ , der dessen Funktion verstärkt. Durch vermehrte MTMR7-Aktivität könnte ein verstärkter proteasomaler Abbau des β -Catenins bewirkt werden, was dessen geringere nukleäre Lokalisation und die verringerte *Topflash*-TCF4- β -Catenin-Reporteraktivität erklären könnte.

4.4.2 MTMR7-vermittelte WNT-Inhibition durch subzelluläre Lokalisation

Die intrazelluläre Lokalisation von MTMR7 wurde bereits diskutiert (s.o.). In Bezug auf die nachhaltige RAS-Inhibition durch MTMR7 ohne rückkoppelnde Aktivierung des WNT-Signalweges, wie sie bei MEK1/2-Inhibitoren bekannt ist [44], erscheint eine Lokalisation in der Nähe von Endosomen möglich. Dabei könnten die elektrostatischen Eigenschaften der Glutamat-reichen, vielfach negativ geladenen *Coiled-Coil*-Domäne von MTMR7 und die positiv geladene K-RAS-Domäne eine Rolle spielen.

In MTMR7-FL-transfizierten, APC-mutierten SW480-Zellen ist der Anteil nukleären, aktiven β -Catenins vermindert. Für die Vorstellung einer durch MTMR7 vermittelten Hemmung, die unabhängig von der Betrachtung des MTMR7 als PPAR γ -Bindepartner ist, sind zwei mögliche Gegebenheiten von zentraler Bedeutung: Erstens dürfte die Inaktivierung β -Catenins durch transkriptionelle Aktivierung des β -Catenin-Zerstörungskomplexes unwahrscheinlich sein, da dieser den Abbau von β -Catenin aufgrund der in KRK-Zelllinien auftretenden APC-Mutationen vermutlich nicht mehr verursachen kann. Zweitens ist aufgrund der möglichen Lokalisation von MTMR7 an intrazellulären Vesikeln und der Bedeutung des Vesikeltransports für den WNT-Signalweg dieser in Bezug auf eine mögliche Inhibition des Signalweges genauer zu beschreiben.

Der WNT-Signalweg beginnt (im Gesunden) über die extrazelluläre Bindung eines WNT-Liganden, wie WNT3a. Der Ablauf des Signalweges ist von der Clathrin-vermittelten Endozytose des Rezeptors abhängig [123, 124]. Nach der Endozytose wird GSK3 β in einem WNT-*on-state* dadurch inaktiviert, dass es in Vesikeln vom Zytoplasma abgetrennt wird. Dadurch kann der Abbau von zytoplasmatischen β -Catenin nicht vorangetrieben werden [124]. Für die Aktivierung des WNT-Signalweges ist folglich ein endozytotischer Prozess obligat, von welchem die Inhibition des β -Catenin-Zerstörungsprozesses abhängt. In SW480-Zellen konnte indes die Hemmung der Endozytose und die Hemmung der GSK3 β keine Abschwächung des WNT-Signals bewirken [123]. Für den Abbau des β -Catenins scheint die Bildung von intrazellulären Vesikeln ein entscheidender Prozess zu sein.

Es erscheint daher möglich, dass der WNT-Signalweg in APC-mutierten Tumorzellen erst nach Ablafen der initialen Endozytose durch MTMR7 gehemmt werden könnte. Für diese Theorie spricht, dass MTMR7 in der Nähe von aufgenommenen Vesikeln lokalisiert sein könnte und dass seine funktionelle *Coiled-Coil*-Domäne mehrere negative Ladungen aufweist (s.o.). Die zentrale Bindedomäne β -Catenins für APC, aber auch TCF/LEF und andere wichtige Liganden besteht aus 12 sogenannten Armadillo-Wiederholungen, welche eine Superhelix bilden [125]. Diese ist mehrfach positiv geladen. Die *Coiled-Coil*-Domäne von MTMR7 könnte aufgrund ihrer negativen Ladung das zytoplasmatisch vermehrt anfallende β -Catenin durch elektrostatische Wechselwirkung binden und eine Interaktion mit der zentralen Bindedomäne des β -Catenins eingehen und dadurch dessen proteasomale Degradation bewirken.

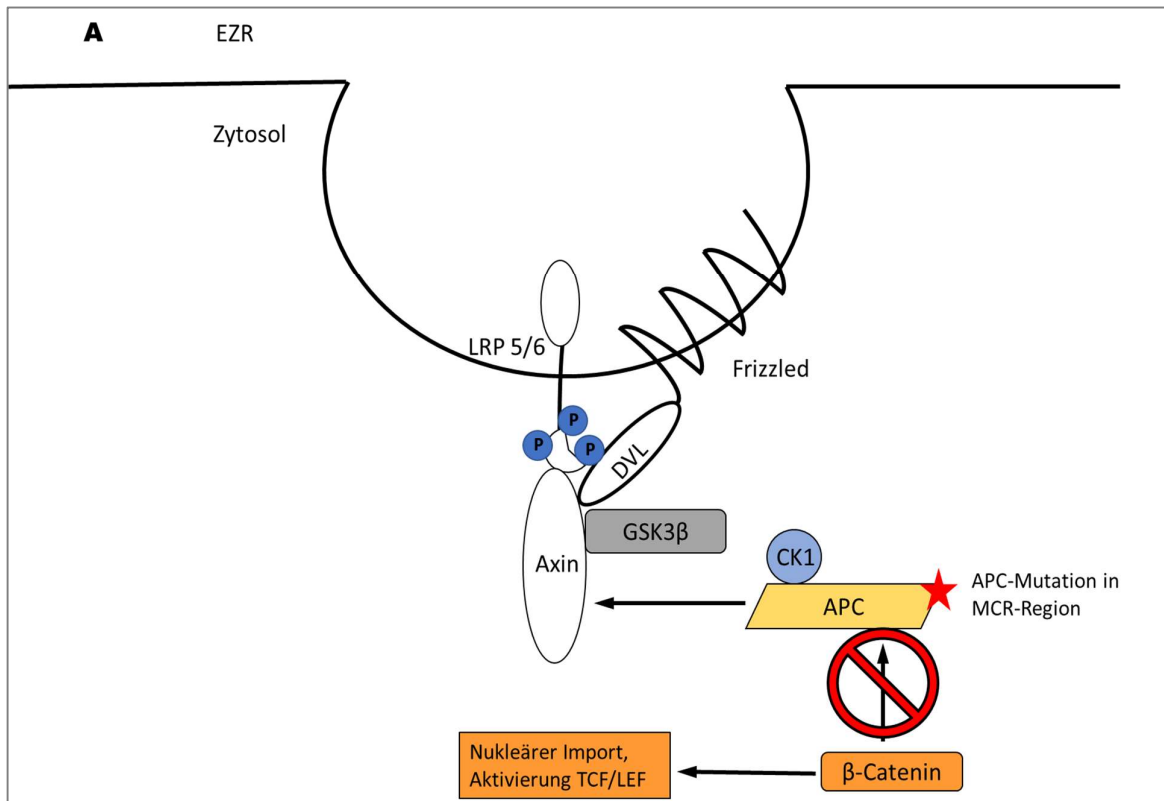
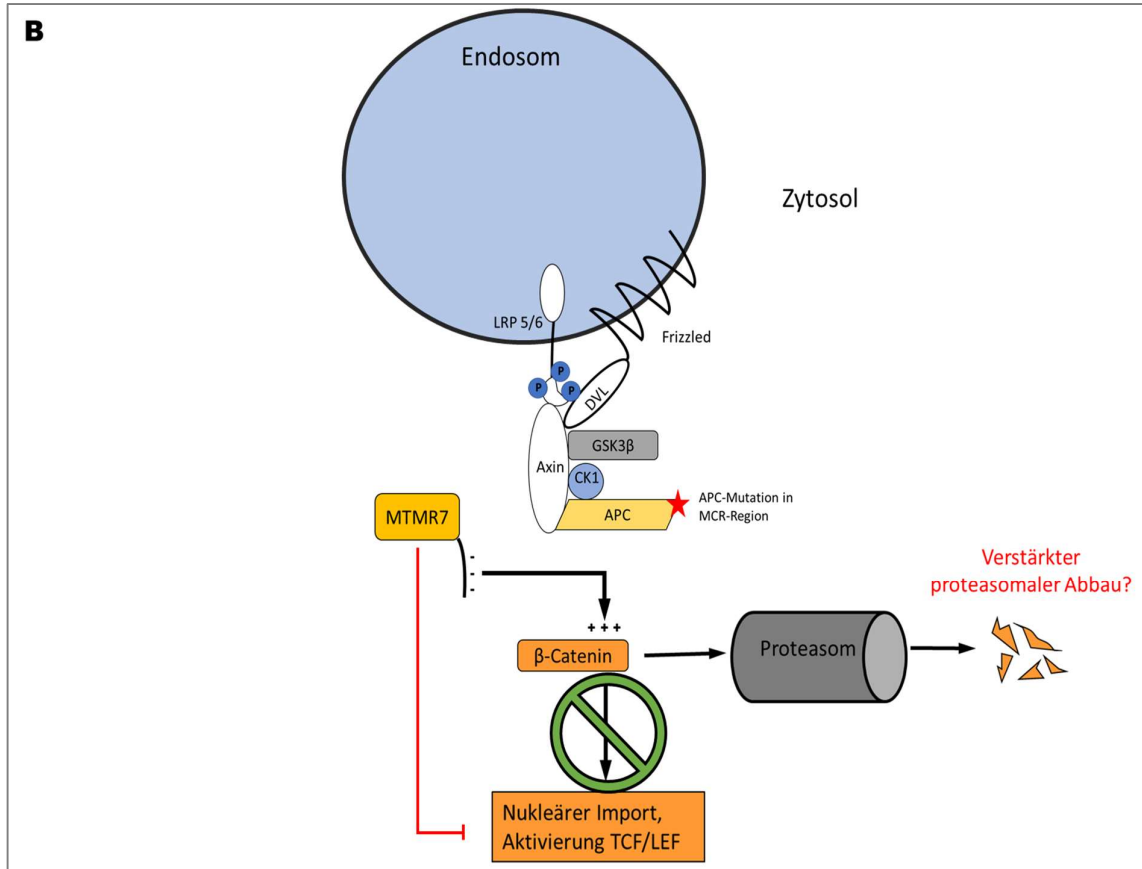


Abbildung 25: Modell: MTMR7- β -Catenin-Interaktion in APC-mutierten Zellen

25A: Die WNT-Signaltransduktion wird durch die Clathrin-vermittelte Internalisierung von Vesikeln vermittelt [123, 124]. Dabei lagert sich APC nach der Endozytose an den β -Catenin-Zerstörungskomplex an [124]. Bei KRK-typischen APC-Mutationen in der MCR-Domäne kann β -Catenin jedoch nicht gebunden und abgebaut werden, es akkumuliert, gelangt in den Kern und überaktiviert TCF/LEF, die wiederum ein proliferatives Genprofil fördern.



25B: Die zentrale Bindungsstelle β -Catenins, welche u.a. TCF/LEF bindet [57, 125], ist mehrfach positiv geladen. Das vermutlich in der Nähe von intrazellulären Vesikeln, wie Endosomen lokalisierte MTMR7 besitzt eine mehrfach negativ geladene *Coiled-Coil*-Domäne. Das sich an die internalisierten Endosomen anlagernde APC kann durch Mutationen nicht an β -Catenin binden, MTMR7 hingegen könnte möglicherweise mit seiner CC-Domäne eine solche Bindung eingehen. Dadurch könnte der nukleäre Import β -Catenins möglicherweise gestoppt und dessen proteasomale Degradation vorangetrieben werden.

4.4.2.1 Bezug zu WNT-Inhibitoren mit Lokalisation in dem ER-Golgi-Netzwerk

Untersuchungen des MTMR7-Bindepartners MTMR9 ergaben dessen Lokalisation im Zytoplasma, sowie am Übergang des endoplasmatischen Retikulums zum Golgi-Apparat [77]. Bei MTMR9-*Knockout*-Versuchen stellte sich heraus, dass die Sekretion von WNT3A abhängig von MTMR9 ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für den aktiven Bindepartner MTMR6 festgestellt [126]. Bei der Überexpression von MTMR9 zeigte sich hingegen ebenfalls eine verlangsamte Vesikelpassage und eine verminderte Sekretion von WNT3a.

In der Diskussion der oben beschriebenen Modelle hängt die Konzentration von zytoplasmatischem β -Catenin in APC-mutierten Tumorzellen allerdings nicht von der Stimulation von WNT3a ab. In Luziferaseversuchen mit SW480-Zellen konnte nach Stimulation durch WNT3a keine vermehrte *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporter-Aktivität im Vergleich zur basalen Promotoraktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Mechanismus, der in *APC*-mutierten Zellen aktives β -Catenin verringert und mit dem auch die Deregulation des exozytotischen Vesikeltransportes einhergeht, kann dennoch prinzipiell diskutiert werden.

Dabei sind die Erkenntnisse über den WNT-Inhibitor TASIN-1 [127] hervorzuheben, wenngleich es neben möglichen gemeinsamen übergeordneten Prinzipien ebenso klar feststellbare Unterschiede in dem molekularen Wirkmechanismus von MTMR7 und TASIN-1 gibt. Die Untersuchungen von TASIN-1 zeigten eine experimentell vielversprechende Hemmung in *APC*-mutierten Tumorzellen. Die Funktionsweise der Hemmung der Cholesterin-Biosynthese unterscheidet sich zwar von der des MTMR7 Enzyms, jedoch könnte die Folge des Mechanismus Ähnlichkeiten mit der Folge der Aktivität von MTMR7 und seinen Bindepartnern haben: Letztlich bewirkt der Einsatz von TASIN-1 in *APC*-mutierten Zellen eine Dysregulation der Homöostase des endoplasmatischen Retikulums, dabei kommt es neben anderen Mechanismen zu einer Reduktion der Aktivierung von AKT [127]. MTMR7 hemmt ebenfalls die Phosphorylierung von AKT [94] und dadurch dessen Aktivierung. Eine Lokalisation zwischen ER und Golgi erscheint aufgrund der dortigen Lokalisation seines inaktiven Bindepartners MTMR9 möglich. Es zeigte sich, dass das Wachstum von KRK-Zellen durch MTMR7 gehemmt wird [94]. Ob dies ebenfalls einen Effekt auf die ER-Homöostase haben könnte, ist unklar. Eine Hypothese, der sich daraus ergebenden Hemmung *APC*-mutierter Zellen, lässt sich gegenwärtig nicht eindeutig ableiten, ein übergeordneter, Apoptose-fördernder Mechanismus, welcher mit der beschriebenen, möglichen Lokalisation zusammenhängen könnte, sollte bei der weiteren Untersuchung des Einflusses von MTMR7 auf *APC*-mutierte KRK-Zellen hingegen ebenfalls in Betracht gezogen werden.

4.4.3 WNT- β -Catenin-Inhibition in *APC*-mutierten KRK-Zellen

Es bleibt festzuhalten, dass MTMR7 als direkter PPAR γ -Bindepartner und als möglicher Interaktionspartner im intrazellulären Vesikeltransport Eigenschaften aufweist, die die oben beschriebenen Mechanismen der β -Catenin-Blockade in *APC* mutierten Zellsystemen ermöglichen könnten. Diese sollten zunächst durch die Charakterisierung einer genauen Interaktion von MTMR7 mit dem WNT-Signalweg überprüft werden. Bislang lässt sich feststellen, dass MTMR7-FL *in vitro* eine Verringerung des nukleären β -Catenins bewirkt und dass MTMR7-CC-Peptid behandelte und MTMR7-FL überexprimierte, *APC*-mutierte Zellen eine geringere WNT-Signalweg gesteuerte Promotoraktivität aufweisen. Des Weiteren zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen an einem Maus-Magenkarzinommodell bereits in begrenzten Gruppengröße nach der Behandlung mit MTMR7-CC-Peptid eine Reduktion der Tumorzellen mit aktiven, nukleären β -Catenin, verglichen mit der mit dem Kontrollpeptid behandelten Gruppe. Die oben erläuterten Hypothesen lassen sich durch die bisherigen Versuchsergebnisse nicht abschließend bewerten.

4.5 PD-L1 Induktion durch MTMR7

Im Rahmen der Luziferaseexperimente, in denen ein *PDL1*-Promoter-Reporter in HEK293T- und HCT116-Zellen untersucht wurde, konnte in beiden Zellsystemen zunächst eine verstärkte Luziferaseaktivität nach der Behandlung mit Rosiglitazone beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen verdeutlichten, dass PD-L1 durch PPAR γ -Agonisten aktiviert wird [100]. Die im zweiten Schritt durchgeführten Versuche mit dem MTMR7-CC-Peptid führten ebenfalls zu einer verstärkten *PDL1*-Promotor-Aktivität. Dabei konnte eine Dosis-Wirkungseffekt beobachtet werden, sodass die stärkste *PDL1*-Promotoraktivität bei 10 μ M MTMR7-CC-Behandlung zu beobachten war. Die Ergebnisse können als ein weiteres Indiz für die Verstärkung von PPAR γ durch MTMR7 gewertet werden. Andererseits könnte eine andere, bislang unbekannte Form der Regulation zwischen der Lipidphosphatase mit dem *PDL1*-Gen stattfinden. Die Annahme einer PPAR γ -unabhängigen Wechselwirkung von MTMR7 und PD-L1 halte ich aktuell jedoch für unbegründet, da sie sich aus den Luziferaseexperimenten nicht ableiten lässt. Dass PPAR γ die PD-L1 Expression reguliert, steht dagegen in dem Kontext zu bisherigen Ergebnissen [65, 67]. MTMR7 könnte die *PDL1* Promotoraktivität daher indirekt über eine Aktivierung von PPAR γ erhöhen [99]. Eine mögliche Aktivierung der PD-L1 Expression durch MAPK-Inhibition [64], was auf MTMR7 zutreffen könnte, unterstreicht diese Hypothese, da durch die Inhibition von ERK1/2 die genomische PPAR γ -Aktivität, wie oben erläutert, verstärkt werden kann.

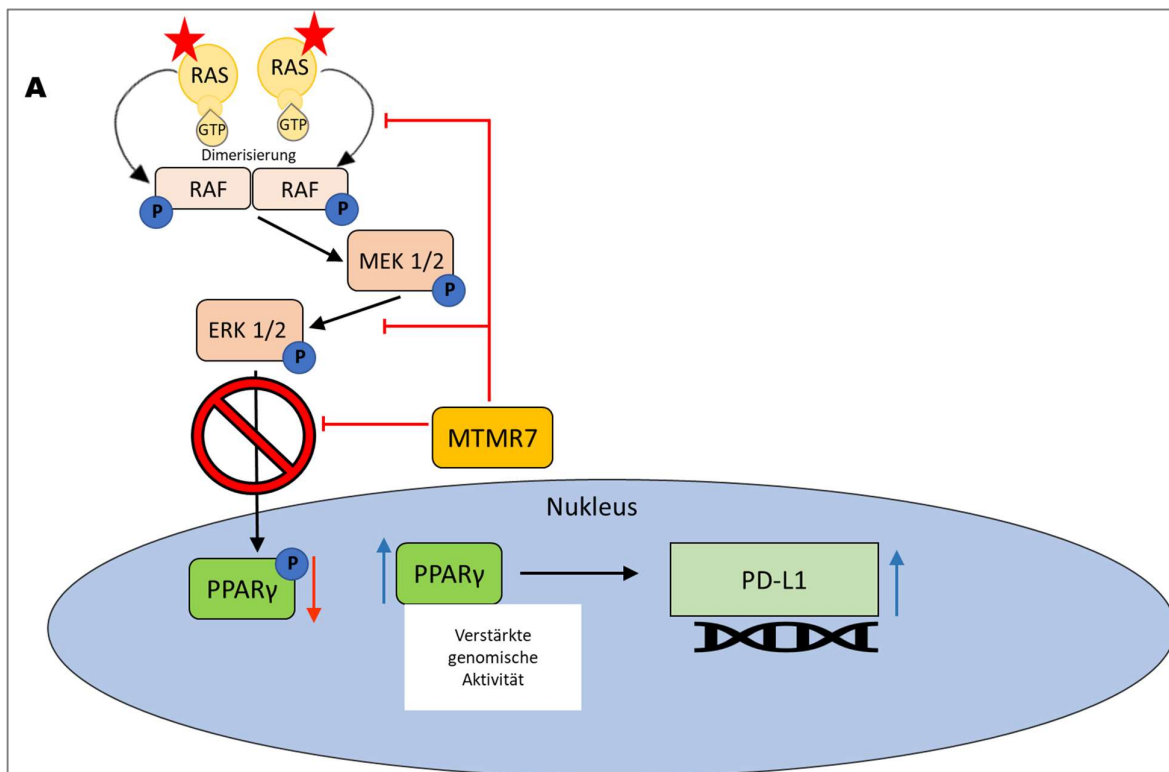


Abbildung 26: Modell der MTMR7-PD-L1-Regulation

MTMR7 inhibiert die Phosphorylierung von ERK1/2 [94]. ERK1/2 gelangt daher nicht in den Nukleus und kann PPAR γ nicht an dessen Ser84-Rest phosphorylieren [48], sodass PPAR γ eine höhere genomische Aktivität aufweist. Durch die verstärkte genomische Wirkung des Kernrezeptors könnte MTMR7 indirekt eine verstärkte PD-L1-Expression bewirken.

In der modernen Tumorthherapie nehmen Checkpointinhibitoren eine wichtige Rolle ein. Oftmals bedeutet in der klinischen Praxis eine PD-L1-Expression eine Therapiemöglichkeit des Tumors [104]. Sollte sich die PD-L1-Expression durch eine auf MTMR7-Peptid-basierende Substanz erhöhen lassen, so ließe sich möglicherweise auch die Effektivität durch bekannte Checkpointinhibitoren verbessern. Sollte MTMR7 oder das in den Experimenten eingesetzte MTMR7-CC-Peptid klinisch einen solchen Effekt aufweisen, so würde dies jedoch im Umkehrschluss auch eine Verstärkung der Immunevasion des Tumors bedeuten. Aus oben genannten Gründen könnte eine verstärkte PD-L1-Expression als erstrebenswert angesehen werden, andererseits zeigt die biochemische Funktion von PD-L1 Gefahren auf. So könnte die bessere Behandlungsmöglichkeit durch eine stärkere Aggressivität des Tumors erkauft sein. Yang et al. haben in einer klinischen Metaanalyse die Prognose von Patienten mit PD-L1-exprimierenden KRK untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass PD-L1 als negativer Prädiktor anzusehen sei [61]. Dabei stellten sie jedoch auch die Prognose verbessernde Behandlung mit PD-L1-blockierenden Antikörpern dar. Die Beantwortung der Frage, ob eine durch Mimikry vermittelte, verstärkte PD-L1-Expression in der Tumorthherapie eher nützlich oder hinderlich ist, kann aktuell noch nicht eindeutig beantwortet werden. Unabhängig von der Funktion des MTMR7-Proteins wird eine genauere Untersuchung in klinischen Studien von Verstärkern der PD-L1-Expression in Kombination mit Checkpointinhibitoren diese Unklarheit zukünftig möglicherweise bereinigen können.

Daher erscheint in jedem Fall eine genauere Untersuchung der molekularen Beziehung von MTMR7 zu PD-L1 erstrebenswert. Eine immunhistochemische Testung könnte dabei am einfachsten *in vivo*-Daten aufzeigen. Die genauere Untersuchung der Interaktion von PPAR γ und PD-L1 unter MTMR7-Behandlung oder Überexpression könnte die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen.

4.6 Beeinflussung der untersuchten Signalwegen durch MTMR7

Die vorliegenden Experimente hatten den Anspruch eine potenzielle Beteiligung von MTMR7 in verschiedenen Signalkaskaden zu prüfen. Die Ergebnisse geben Auskunft darüber, welche molekularen Signalwege MTMR7 beeinflussen könnte und daher genauer untersucht werden könnten.

Dabei scheint die Interaktion von MTMR7 und PPAR γ sowie die Hemmung der EGFR-RAS-Kaskade als am besten evaluiert. Eingangs wurden die Hypothesen von möglichen Einflüssen in dem WNT- β -Catenin-Signalweg und der Expression von PD-L1 aufgestellt. Des Weiteren schien eine Verbindung zu der NF κ B-Kaskade möglich. Während bei den erstgenannten Komponenten durchaus Verbindungen festzustellen waren, zeigte sich dies bei Luziferase-Versuchen mit NF κ B-transfizierten Zellen nicht. Die Hypothese war, dass genomisch stärker aktiviertes PPAR γ eine Hemmung von NF κ B bewirkt. Ein entsprechender Effekt war jedoch nicht zu beobachten, sodass dieser eine vermutlich untergeordnete Rolle einnimmt.

Die festgestellte Hemmung des WNT-Signales *in vitro* muss zweifelsohne *in vivo* noch weitergehend überprüft werden. Nimmt man die *in vitro* statistisch auswertbare Beobachtung an, so stellt sich die Frage, in welcher Form MTMR7 sowohl die EGFR-RAS-Kaskade als auch den WNT-Signalweg hemmt. Hierfür ist zunächst eine genauere Untersuchung der Interaktion in letzterem Signalweg notwendig. Mögliche Theorien bzw. Modelle lassen sich bereits beleuchten (s.o.), sollten aber aufgrund einer fehlenden ausführlicheren Analyse der Beeinflussung einzelner Komponenten des WNT-Signalweges kritisch hinterfragt werden.

Die Auswirkung auf die PD-L1-Expression sollte ebenfalls *in vivo* weiter untersucht werden. Sollten diese Daten die präsentierte These bestätigen, könnte geprüft werden, ob ein MTMR7-ähnlicher Wirkstoff eine Rationale für ein Mimikry mit Checkpoint-Inhibitoren darstellt.

Die nachhaltige Hemmung der RAS-Kaskade wird möglicherweise an intrazellulären Vesikeln wie Endosomen vermittelt. Für die Prüfung und genauere Untersuchung der Erkenntnisse hinsichtlich anderer Signalwege ist eine genauere Charakterisierung der RAS-Inhibition jedoch zunächst unerlässlich. Die Zusammenfassung der durch MTMR7 beeinflussten Signalwege ist in Abb. 27 dargestellt.

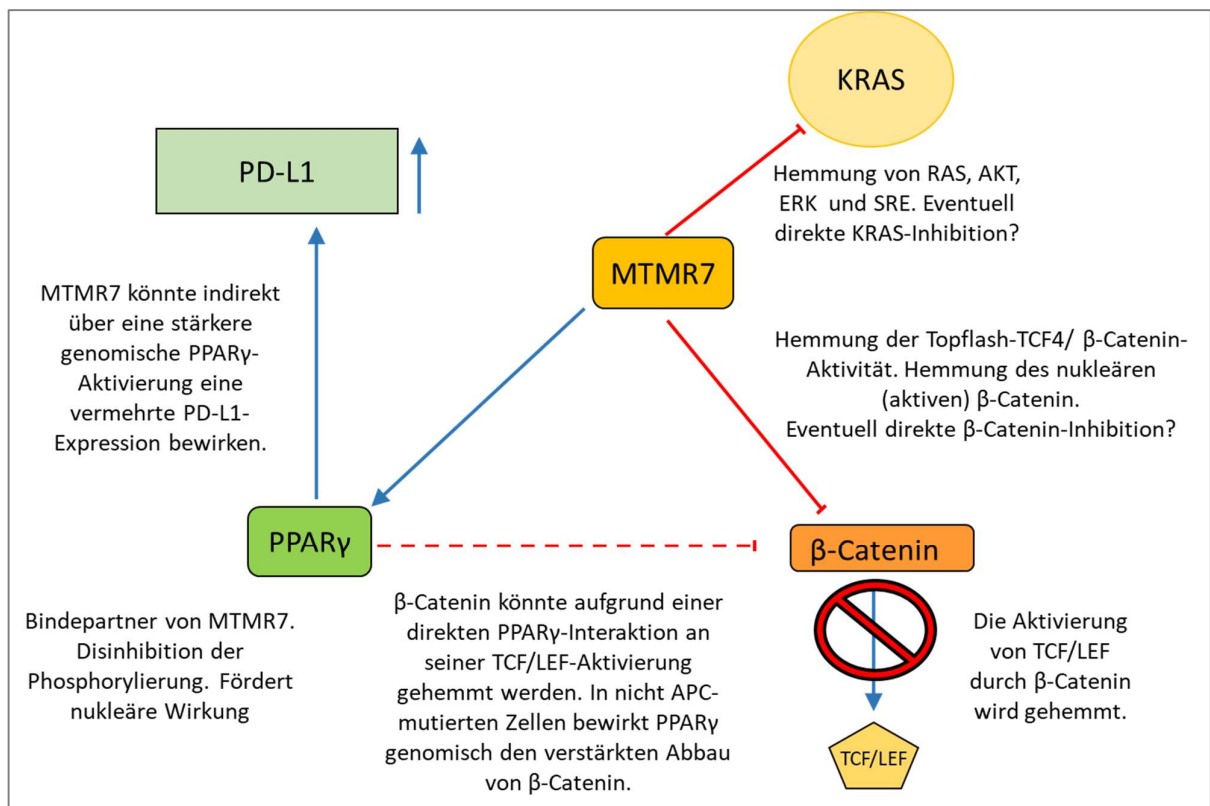


Abbildung 27: Mögliche und festgestellte molekulare Wechselwirkungen von PPAR γ , PD-L1, β -Catenin und KRAS mit MTMR7

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Hintergrund

Die molekulare Pathologie der weit verbreiteten kolorektalen Karzinome beruht auf Treibermutationen in den WNT- β -Catenin- und EGF-assoziierten Signalwegen. Im Besonderen stellen *KRAS*-Mutationen in der Tumorthherapie eine große Herausforderung dar. Die Lipidphosphatase MTMR7 gehört zu den Myotubularinen, eine Gruppe von Ptlns-Phosphatasen, deren Funktion im Vesikeltransport beschrieben ist. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass MTMR7 in gastro-intestinalen Tumormodellen eine Verringerung der K-RAS nachgeschalteten MEK1/2-ERK1/2 und AKT-Phosphorylierungen bewirkt. Zudem wurde eine agonistische Aktivität zu dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ) gezeigt. Dadurch entfaltet PPAR γ seine genomische, antiproliferative Wirkung. In der aktuellen Arbeit wurden neben der EGFR-RAS-Signalkaskade weitere Signalwege auf den Einfluss durch MTMR7 untersucht.

5.2 Material und Methoden

Es wurden Luziferase-Reporter-Tests durchgeführt, bei denen Modell- und kolorektale Tumorzellen mit Vektoren wichtiger Signalwege transfiziert wurden (PPAR γ Response Element (PPRE), Serum Response Element (SRE), *Topflash*-TCF4/ β -Catenin, NF κ B-responsive Reporter, *PDL1* Promotor). Zudem wurden die Zellen mit MTMR7-Expressionsplasmid kotransfiziert, oder mit MTMR7-CC-Peptid behandelt. Des Weiteren wurden Western Blots und immun-histochemische Färbungen eines gastrointestinalen Maus-Tumormodells durchgeführt.

5.3 Ergebnisse

MTMR7 hemmte die Serum *response* element-abhängige Promotoraktivität, sowie die *Topflash*-TCF4/ β -Catenin-Reporter-Aktivität und verringerte den zellulären Gehalt von nukleärem aktivem β -Catenin. Die Aktivität des *PDL1* Promotors und des PPRE wurden dagegen durch die Behandlung mit dem MTMR7-CC-Peptid verstärkt. Die Aktivität von NF κ B wurde nicht beeinflusst. Immunhistochemische Auswertungen des Maus-Modells zeigen eine relative Verringerung von nukleärem β -Catenin, ERK1/2 und einen verminderten Ki67-Index.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

MTMR7 bewirkt eine Hemmung der EGFR-RAS-Signalkaskade auf der genomischen Ebene. Diese Hemmung könnte wiederum eine verminderte Inhibition von PPAR γ bewirken. Dadurch und durch die bereits bekannte agonistische Interaktion von MTMR7 und PPAR γ könnte die PPAR γ -abhängige Aktivierung des *PDL1*-Promotors verstärkt werden. Die Hemmung des WNT- β -Catenin-Signalweges könnte durch eine Interaktion oder Beeinflussung von PPAR γ und β -Catenin vermittelt sein, wodurch die Aktivität des Letzteren vermindert wird. Eine PPAR γ -unabhängige WNT-Inhibition erscheint auch möglich und könnte mit der subzellulären Lokalisation von MTMR7 zusammenhängen. Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten daraufhin, dass MTMR7 als Tumorsuppressor wirken kann. Die molekularen Mechanismen sollten in zukünftigen Experimenten auf eine mögliche therapeutische Relevanz im KRK geprüft werden.

6 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Schroeder, Torsten Christian
Geburtsdatum: 29.08.1994
Geburtsort: Kiel
Familienstand: verheiratet
Vater: Dr. med. Michael Schroeder
Mutter: Gisela Schroeder

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

15.04.2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
10.2017 - 04.2021 Hauptstudium, klinischer Abschnitt, UMM
06.09.2017 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
10.2015 - 09.2017 Grundstudium, vorklinischer Abschnitt, UMM

SCHULISCHER WERDEGANG/ AUSBILDUNG

10.2013 – 09.2015 Johann-Herrmann-Lubinus-Schule für Physiotherapie, Kiel
29.05.2013 Abitur
2005 - 2013 Gymnasium Kronshagen
2001 - 2005 Grundschule Achterwehr

7 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Matthias Ebert erstellt. Ich danke ihm für die Förderung, insbesondere im Rahmen der Doktorandenseminare.

Frau PD. Dr. rer. nat. Elke Burgermeister danke ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die Beurteilung der wöchentlichen Berichte sowie der Hilfestellung bei Fragen zum weiteren Vorgehen. Außerdem möchte ich mich für die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit bedanken, die du mir vorgelebt hast.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Betreuer, Dr. med. Philip Weidner bedanken, für die Einarbeitung und die dabei aufgebrachte Geduld mit mir, für das immer offene Ohr, Telefonate zu ungewöhnlichen Uhr- und Wochenzeiten und für die Unterstützung bei Schwierigkeiten aller Art sowie für die Durchsicht der Arbeit. Danke dir für die exzellente Betreuung in den vergangenen Jahren.

Herrn Frank Herweck möchte ich für die Hilfe in der alltäglichen Laborarbeit danken, ebenso für das Einarbeiten in die Methode des Western Blots und die immer freundschaftliche Atmosphäre während der Arbeit.

Frau Olga Skabkina danke ich für die Erstellung der immer wieder benötigten Reporter-Plasmide sowie der Einarbeitung in die Methode der subzellulären Fraktionierung. Danke für deine Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Alexandra Kerner danke ich für die Bestellungen der benötigten Versuchsmaterialien und der freundschaftlichen Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Laura Helm, Beifang Li, Wenyue Wu sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Burgermeister für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Vera für die liebevolle Unterstützung und Aufmunterung während all der Zeit. Ebenso danke ich meiner Familie für die Unterstützung verschiedenster Art, danke dass ihr immer da seid.

Dieses Projekt wurde durch folgende Drittmittelförderungen ermöglicht:

Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Mannheim (Projektnummer 81000140.5) und intramurale Förderung SEED (Dr. med. Philip Weidner / AG Burgermeister, Med. Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg).

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
2. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.
3. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. Br J Surg, 2002. **89**(7): p. 845-60.
4. *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis.*, in RKI, Berlin, R. Koch-Institut, Editor. 2015.
5. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
6. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(1): p. 3-20.
7. Grady, W.M. and S.D. Markowitz, *The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(3): p. 762-72.
8. Weidner, P., et al., *Myotubularin Related Protein 7 – ein dualer Ras- und mTORC-Inhibitor im kolorektalen Karzinom*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(08): p. FV 14.
9. Weidner, P., et al., *Myotubularin Related Protein 7 – a Ras Pathway Inhibitory Protein and Positive Regulator of PPARgamma in Colorectal Cancer*. Oncol Res Treat, 2018. **41 Suppl 1**: p. 1-221.
10. Roncucci, L. and F. Mariani, *Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket?* Eur J Intern Med, 2015. **26**(10): p. 752-6.
11. Copija, A., et al., *Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).
12. De Roock, W., et al., *KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer*. Lancet Oncol, 2011. **12**(6): p. 594-603.
13. Normanno, N., et al., *Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2009. **6**(9): p. 519-527.
14. Bienz, M. and H. Clevers, *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. Cell, 2000. **103**(2): p. 311-20.
15. Schirripa, M. and H.J. Lenz, *Biomarker in Colorectal Cancer*. Cancer J, 2016. **22**(3): p. 156-64.
16. Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. Nature Reviews Cancer, 2011. **11**(11): p. 761-774.
17. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 692-6.
18. Wee, P. and Z. Wang, *Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways*. Cancers (Basel), 2017. **9**(5).
19. Berdeaux, R., et al., *Mechanical Stimulation Induces mTOR Signaling via an ERK-Independent Mechanism: Implications for a Direct Activation of mTOR by Phosphatidic Acid*. PLoS ONE, 2012. **7**(10): p. e47258.
20. Treisman, R., *The serum response element*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(10): p. 423-6.

21. O'Donnell, J.S., et al., *PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux*. Semin Cancer Biol, 2017.
22. Zhao, B., et al., *Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(3): p. 3980-4000.
23. Sartore-Bianchi, A., et al., *PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1851-7.
24. Gu, M., Y. Gao, and P. Chang, *KRAS Mutation Dictates the Cancer Immune Environment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Other Adenocarcinomas*. Cancers (Basel), 2021. **13**(10).
25. Jean, S. and A.A. Kiger, *Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance*. Journal of Cell Science, 2014. **127**(5): p. 923-928.
26. Ijuin, T., *Phosphoinositide phosphatases in cancer cell dynamics-Beyond PI3K and PTEN*. Semin Cancer Biol, 2019. **59**: p. 50-65.
27. Cui, B., J. Tao, and Y. Yang, *Studies on the expression patterns of class I PI3K catalytic subunits and its prognostic significance in colorectal cancer*. Cell Biochem Biophys, 2012. **62**(1): p. 47-54.
28. Castellano, E. and J. Downward, *RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 261-74.
29. Cathomas, G., *PIK3CA in Colorectal Cancer*. Frontiers in Oncology, 2014. **4**.
30. Ahmed, D., et al., *Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines*. Oncogenesis, 2013. **2**: p. e71.
31. Besnard, A., et al., *Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 35.
32. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 767-79.
33. Lee, S.K., J.H. Hwang, and K.Y. Choi, *Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis*. Adv Biol Regul, 2018. **68**: p. 46-54.
34. Aghabozorgi, A.S., et al., *Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives*. Biochimie, 2019. **157**: p. 64-71.
35. Zhang, L. and J.W. Shay, *Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(8).
36. Tacchella-Benites, O., et al., *Axin phosphorylation in both Wnt-off and Wnt-on states requires the tumor suppressor APC*. PLoS Genet, 2018. **14**(2): p. e1007178.
37. Powell, S.M., et al., *APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis*. Nature, 1992. **359**(6392): p. 235-7.
38. Walther, A., R. Houlston, and I. Tomlinson, *Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis*. Gut, 2008. **57**(7): p. 941-50.
39. Sieber, O.M., I.P. Tomlinson, and H. Lamlum, *The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor--genetics, function and disease*. Mol Med Today, 2000. **6**(12): p. 462-9.
40. Schell, M.J., et al., *A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11743.
41. Huang, X. and B. Guo, *Adenomatous polyposis coli determines sensitivity to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis in colon cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9245-51.

42. Lee, S.K., J.H. Hwang, and K.Y. Choi, *Interaction of the Wnt/beta-catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both beta-catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis*. *Adv Biol Regul*, 2018. **68**: p. 46-54.
43. Jeong, W.J., E.J. Ro, and K.Y. Choi, *Interaction between Wnt/beta-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of beta-catenin and RAS by targeting the Wnt/beta-catenin pathway*. *NPJ Precis Oncol*, 2018. **2**(1): p. 5.
44. Zhan, T., et al., *MEK inhibitors activate Wnt signalling and induce stem cell plasticity in colorectal cancer*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2197.
45. Tachibana, K., et al., *The Role of PPARs in Cancer*. *PPAR Res*, 2008. **2008**: p. 102737.
46. Järvinen, R., et al., *Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(3): p. 357-61.
47. Motawi, T.K., et al., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Obesity and Colorectal Cancer: the Role of Epigenetics*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10714.
48. Luconi, M., G. Cantini, and M. Serio, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer?* *Steroids*, 2010. **75**(8-9): p. 585-94.
49. Janani, C. and B.D. Ranjitha Kumari, *PPAR gamma gene--a review*. *Diabetes Metab Syndr*, 2015. **9**(1): p. 46-50.
50. Grygiel-Gorniak, B., *Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review*. *Nutr J*, 2014. **13**: p. 17.
51. Vallée, A. and Y. Lecarpentier, *Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/ β -Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 745.
52. Burgermeister, E., et al., *Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(3): p. 803-17.
53. Medina-Gomez, G., S. Gray, and A. Vidal-Puig, *Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1)*. *Public Health Nutr*, 2007. **10**(10A): p. 1132-7.
54. Ahmadian, M., et al., *PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. *Nature Medicine*, 2013. **99**(5): p. 557-566.
55. Kim, J.A., et al., *Troglitazone activates p21Cip/WAF1 through the ERK pathway in HCT15 human colorectal cancer cells*. *Cancer Lett*, 2002. **179**(2): p. 185-95.
56. Lecarpentier, Y., et al., *Interactions between PPAR Gamma and the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway in Type 2 Diabetes and Colon Cancer*. *PPAR Res*, 2017. **2017**: p. 5879090.
57. Liu, J., et al., *Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(15): p. 5827-37.
58. Chen, J., et al., *Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(3): p. 409-16.
59. Kythreotou, A., et al., *PD-L1*. *J Clin Pathol*, 2018. **71**(3): p. 189-194.
60. Escors, D., et al., *The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells*. *Signal Transduct Target Ther*, 2018. **3**: p. 26.

61. Yang, L., R. Xue, and C. Pan, *Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Onco Targets Ther*, 2019. **12**: p. 3671-3682.
62. Le, D.T., et al., *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(26): p. 2509-20.
63. Garcia-Diaz, A., et al., *Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression*. *Cell Rep*, 2017. **19**(6): p. 1189-1201.
64. Ebert, P.J.R., et al., *MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 609-621.
65. Chowdhury, P.S., et al., *PPAR-Induced Fatty Acid Oxidation in T Cells Increases the Number of Tumor-Reactive CD8(+) T Cells and Facilitates Anti-PD-1 Therapy*. *Cancer Immunol Res*, 2018. **6**(11): p. 1375-1387.
66. Bouhellel, M.A., et al., *PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties*. *Cell Metab*, 2007. **6**(2): p. 137-43.
67. Hartley, G.P., et al., *Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation*. *Cancer Immunol Res*, 2018. **6**(10): p. 1260-1273.
68. Gu, L., et al., *PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182692.
69. Dolcet, X., et al., *NF-kB in development and progression of human cancer*. *Virchows Arch*, 2005. **446**(5): p. 475-82.
70. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin, *IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2625-32.
71. Van Antwerp, D.J., et al., *Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B*. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(3): p. 107-11.
72. Chen, F., et al., *Loss of Ikkbeta promotes migration and proliferation of mouse embryo fibroblast cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(48): p. 37142-9.
73. Sakamoto, K. and S. Maeda, *Targeting NF-kappaB for colorectal cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(6): p. 593-601.
74. Takayama, T., et al., *Chemoprevention of colorectal cancer-experimental and clinical aspects*. *J Med Invest*, 2009. **56**(1-2): p. 1-5.
75. Raess, M.A., et al., *WANTED - Dead or alive: Myotubularins, a large disease-associated protein family*. *Adv Biol Regul*, 2017. **63**: p. 49-58.
76. Wrighton, K.H., *DNA repair: a new fan of the Fanconi anaemia pathway*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 603.
77. Doubravská, L., et al., *Human myotubularin-related protein 9 regulates ER-to-Golgi trafficking and modulates WNT3A secretion*. *Experimental cell research*, 2020. **386**(1): p. 111709-111709.
78. Hnia, K., et al., *Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(6): p. 317-27.
79. Begley, M.J. and J.E. Dixon, *The structure and regulation of myotubularin phosphatases*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005. **15**(6): p. 614-620.
80. Robinson, F.L. and J.E. Dixon, *Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides*. *Trends in Cell Biology*, 2006. **16**(8): p. 403-412.
81. Berger, P., et al., *Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12177-82.

82. Cao, C., et al., *Sequential Actions of Myotubularin Lipid Phosphatases Regulate Endosomal PI(3)P and Growth Factor Receptor Trafficking*. *Molecular Biology of the Cell*, 2008. **19**(8): p. 3334-3346.
83. Söhn, M., *The function of the lipid phosphatase MTMR7 in anti-EGFR therapy resistance of colorectal cancer (CRC)*. 2018.
84. Senderek, J., et al., *Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(3): p. 349-56.
85. Azzedine, H., et al., *Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(5): p. 1141-53.
86. Bolino, A., et al., *Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 17-9.
87. Tronchère, H., et al., *Myotubularins and associated neuromuscular diseases*. *Clinical Lipidology*, 2012. **7**(2): p. 151-162.
88. Hnia, K., et al., *Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase Jumpy/MTMR14 knockout mice muscle*. *Adv Biol Regul*, 2012. **52**(1): p. 98-107.
89. Fetalvero, K.M., et al., *Defective Autophagy and mTORC1 Signaling in Myotubularin Null Mice*. *Molecular and Cellular Biology*, 2012. **33**(1): p. 98-110.
90. Lorenzo, O., *Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomelated functions*. *Journal of Cell Science*, 2006. **119**(14): p. 2953-2959.
91. Mochizuki, Y. and P.W. Majerus, *Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(17): p. 9768-9773.
92. Yoo, Y.D., et al., *The human myotubularin-related protein suppresses the growth of lung carcinoma cells*. *Oncol Rep*, 2004. **12**(3): p. 667-71.
93. Zheng, B., X. Yu, and R. Chai, *Myotubularin-related phosphatase 3 promotes growth of colorectal cancer cells*. *ScientificWorldJournal*, 2014. **2014**: p. 703804.
94. Weidner, P., et al., *Myotubularin-related protein 7 inhibits insulin signaling in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(31): p. 50490-50506.
95. Sanchez-Juan, P., et al., *Genome-wide study links MTMR7 gene to variant Creutzfeldt-Jakob risk*. *Neurobiol Aging*, 2012. **33**(7): p. 1487 e21-8.
96. Chu, P.L., S. Keum, and D.A. Marchuk, *A novel genetic locus modulates infarct volume independently of the extent of collateral circulation*. *Physiol Genomics*, 2013. **45**(17): p. 751-63.
97. Guo, L., et al., *Lipid phosphatases identified by screening a mouse phosphatase shRNA library regulate T-cell differentiation and Protein kinase B AKT signaling*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(20): p. E1849-E1856.
98. Weidner, P., *Die Interaktion des Kernrezeptors PPAR γ mit der Lipidphosphatase MTMR7 im kolorektalen Karzinom*. 2018.
99. Weidner, P., et al., *Myotubularin-related protein 7 activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Oncogenesis*, 2020. **9**(6): p. 59.
100. Gutting, T., et al., *PPAR γ induces PD-L1 expression in MSS+ colorectal cancer cells*. *Oncoimmunology*, 2021. **10**(1): p. 1906500.

101. Regel, I., et al., *Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2*. Gastroenterology, 2012. **143**(1): p. 99-109 e10.
102. Tencer, L., et al., *Rosiglitazone induces caveolin-1 by PPARgamma-dependent and PPARE-independent mechanisms: the role of EGF receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance*. Anticancer Res, 2008. **28**(2A): p. 895-906.
103. Wagstaff, A.J. and K.L. Goa, *Rosiglitazone: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2002. **62**(12): p. 1805-37.
104. Yaghoubi, N., et al., *PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer*. Biomed Pharmacother, 2019. **110**: p. 312-318.
105. Parke, D., *Construction of mobilizable vectors derived from plasmids RP4, pUC18 and pUC19*. Gene, 1990. **93**(1): p. 135-7.
106. Thompson, J., et al., *A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 863-9.
107. Doumpas, N., et al., *TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes*. Embo j, 2019. **38**(2).
108. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
109. Pyo, J.S., G. Kang, and J.H. Sohn, *Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis*. Int J Biol Markers, 2016. **31**(2): p. e204-10.
110. Segales-Rojas, P., et al., *Association of ki67 Index with Recurrence in Gastrointestinal Stromal Tumors*. J Gastrointest Cancer, 2018. **49**(4): p. 543-547.
111. Weiß, C., *Basiswissen Medizinische Statistik*. Vol. 7. Auflage. 2019.
112. Timm, M., et al., *Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays*. Cytotechnology, 2013. **65**(5): p. 887-94.
113. Brayton, C.F., *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. Cornell Vet, 1986. **76**(1): p. 61-90.
114. Hancock, J.F., *Ras proteins: different signals from different locations*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 373-84.
115. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(11): p. 828-51.
116. Gelabert-Baldrich, M., et al., *Dynamics of KRas on endosomes: involvement of acidic phospholipids in its association*. Faseb j, 2014. **28**(7): p. 3023-37.
117. Burns, K.A. and J.P. Vanden Heuvel, *Modulation of PPAR activity via phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(8): p. 952-60.
118. Lecarpentier, Y., et al., *Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1248.
119. Vallée, A., et al., *Opposite Interplay Between the Canonical WNT/ β -Catenin Pathway and PPAR Gamma: A Potential Therapeutic Target in Gliomas*. Neurosci Bull, 2018. **34**(3): p. 573-588.
120. Ku, Y.H., et al., *Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation*. BMC Pharmacol Toxicol, 2017. **18**(1): p. 62.
121. Lefebvre, A.M., et al., *Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1053-7.
122. Saez, E., et al., *Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1058-61.

123. Blitzer, J.T. and R. Nusse, *A critical role for endocytosis in Wnt signaling*. BMC Cell Biol, 2006. **7**: p. 28.
124. Taelman, V.F., et al., *Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes*. Cell, 2010. **143**(7): p. 1136-48.
125. Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis, *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin*. Cell, 1997. **90**(5): p. 871-82.
126. Silhankova, M., et al., *Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells*. The EMBO Journal, 2010. **29**(24): p. 4094-4105.
127. Zhang, L., et al., *Cholesterol Depletion by TASIN-1 Induces Apoptotic Cell Death through the ER Stress/ROS/JNK Signaling in Colon Cancer Cells*. Mol Cancer Ther, 2018. **17**(5): p. 943-951.

9 PUBLIKATIONEN

Weidner, P., Söhn, M., **Schroeder**, T., Helm, L., Hauber, V., Gutting, T., Betge, J., Röcken, C., Rohrbacher, F. N., Pattabiraman, V. R., Bode, J. W., Seger, R., Saar, D., Nunes-Alves, A., Wade, R. C., Ebert, M. P. A., Burgermeister, E. Myotubularin-related protein 7 activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Oncogenesis*, 2020. 9(6): p. 59.

Gutting, T., Hauber, V., Pahl, J., Klapproth, K., Wu, W., Dobrota, I., Herweck, F., Reichling, J., Helm, L., **Schroeder**, T., Li, B., Weidner, P., Zhan, T., Eckardt, M., Betge, J., Belle, S., Sticht, C., Gaiser, T., Boutros, M., Ebert, M. P. A., Cerwenka, A., Burgermeister, E., PPAR γ induces PD-L1 expression in MSS+ colorectal cancer cells. *Oncoimmunology*, 2021. 10(1): p. 1906500.

9.1 Kongressbeitrag

Peptidvermitteltes Mimikry von MTMR7 erhöht die PD-L1-Expression in vivo
P. Weidner, T. **Schroeder**, T. Gutting, J. Reichling, T. Gaiser, M. Ebert, E. Burgermeister (Mannheim), *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2020, DGVS Digital: BEST OF DGVS; 58(08): e130
DOI: 10.1055/s-0040-1716085