

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

Molekulare Mechanismen der pharmakologischen Resistenz
kolorektaler Karzinomzelllinien gegen das Chemotherapieregime
FOLFIRI

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christiane Andrea Peschel

aus
München

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Jörg Kumbrink

Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. F. Kolligs
Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-
Baildon

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1.1 Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKRK).....	9
1.2 Therapie des Kolorektalkarzinoms.....	10
1.2.1 Chemotherapeutika und deren molekulare Wirkmechanismen	10
1.2.2 Aktuelle Therapie des metastasierten Kolorektalkarzinoms	13
1.2.3 Primäre und sekundäre Chemotherapieresistenz	16
1.3 Genexpressionssignaturen als Biomarker	17
2. Zielsetzung der Doktorarbeit	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Chemikalien und Reagenzien	19
3.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.3 Geräte.....	21
3.4 Kits.....	21
3.5 Zelllinien	22
3.6 Primer für RT-qPCR	23
3.7 Software	23
4. Methoden	24
4.1 Zellkultur und Etablierung der FOLFIRI-Resistenz	24
4.2 IC50 Bestimmung	26
4.3 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	28
4.4 Apoptose Assay und Zellzyklusanalyse.....	31
4.5 Next generation sequencing (NGS).....	33
4.6 RNA-Sequenzierung.....	33
4.7 Bioinformatische Datenanalyse und Statistik.....	34
4.7.1 Auswertung und statistische Analyse der Zellkulturexperimente.....	34
4.7.2 Analyse der RNA-Sequenzierung	34
4.8 Analyse der Genontologie	35
4.9 Klinische und transkriptomische Daten.....	36
4.10 Überlebenszeitanalyse	36

5. Ergebnisse	37
5.1 Etablierung FOLFIRI-resistenter Zelllinien-Äquivalente	37
5.2 Charakterisierung der Zelllinien und Nachweis biologischer Effekte.....	39
5.2.1 Auswirkung der erworbenen FOLFIRI-Resistenz auf die Apoptoseinduktion .	39
5.2.2 Veränderungen von Genexpression und Morphologie bei Resistenzentwicklung.....	43
5.2.3 Vergleich des Mutationsstatus der Zelllinien und Überprüfung auf relevante DNA Mutationen	46
5.3 RNA-Sequenzierung.....	47
5.3.1 Qualitätssicherung	48
5.3.2 Verarbeitung der FastQ Dateien zu rohen Zählraten.....	50
5.3.3 Von rohen Zählraten zu Genen: Analyse der unterschiedlich exprimierten Gene mit Limma-Voom	51
5.3.4 Einteilung der Signaturgene der Zelllinien nach funktionellen Merkmalen	55
5.4 Vergleich und Erweiterung der zellulären Gensignatur mit dem klinischen Datenset GSE62322.....	58
5.5 Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der differenziell exprimierten Gene mit dem Kolon-Adenokarzinom (COAD) Datenset des Krebsgenomatlas (TCGA)	62
6. Diskussion.....	66
6.1 Verwendete Tumorzelllinien als Modellsystem für das mKRK.....	66
6.2 Aktivierung Resistenz-assoziiertes Gene in Colo205R, HT29R und SW480R.....	67
6.3 Identifizierung resistenz-assoziiertes Gene: Zelluläre FOLFIRI-12-Gen-Signatur .	69
6.4 Untersuchung der Relevanz der zellulären Gensignatur in klinischen Datensätzen	71
6.5 Kürzeres Gesamtüberleben bei Überexpression von <i>TACSTD2</i> , <i>PERP</i> , <i>CAV2</i> , <i>SERPINE2</i> und <i>TNC</i>	72
Anhang	80
Literaturverzeichnis.....	83
Eidesstattliche Erklärung	96
Danksagung.....	97
Lebenslauf	98

Zusammenfassung

Metastasierung und Therapieresistenz stellen die wesentlichen Hindernisse bei der kurativen Behandlung des Kolorektalkarzinoms (KRK) dar und sind Hauptursache für die krebisbedingte Sterblichkeit. Bei etwa einem Viertel der KRK-Patient*innen liegen bei Erstdiagnose Fernmetastasen vor, bei ca. der Hälfte der Erkrankten treten im Verlauf Fernmetastasen auf (Kumbrink et al., 2021; Van Cutsem & Oliveira, 2009; Vatandoust et al., 2015).

Fluoropyrimidin-basierte Chemotherapieregime sind das Grundgerüst der systemischen KRK-Therapie, welche durch weitere klassische Zytostatika sowie Antikörper-basierte Wirkstoffe erweitert werden kann. Das Kombinationsschema bestehend aus 5-Fluoruracil, Irinotecan und Leucovorin – syn. FOLFIRI – wird bei metastasiertem KRK (mKRK) als Erst- oder Zweitlinientherapie eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Trotz der Wirksamkeit dieser Kombinationsbehandlung, durch die die Überlebensrate deutlich verbessert werden konnte, führen intrinsische und erworbene Resistenzmechanismen zur Progression der Krankheit (Jensen et al., 2015; Lyskjær et al., 2019).

Um molekularen Mechanismen und Biomarker der FOLFIRI-Resistenz auf Transkriptomebene zu identifizieren, wurden aus den KRK -Zelllinien Colo205, HT29 und SW480 drei FOLFIRI-resistente Subzelllinien durch kontinuierliche Behandlung mit steigenden FOLFIRI-Konzentrationen hergestellt. Als biologische Effekte der FOLFIRI-Resistenz konnten Änderungen in der Genexpression, morphologische Veränderungen sowie Anpassung des Zellzyklus und Zelltod-Resistenz beobachtet werden.

Zur Identifikation von resistenz-assoziierten Expressionssignaturen oder potentiell prognostischen Biomarkern wurde eine RNA-Sequenzierung der parentalen sowie der resistenten Zelllinien durchgeführt.

Insgesamt 284 differentiell exprimierte Gene (DEGs) wurden nach der bioinformatischen Analyse der RNA-Sequenzierung von 24 Proben ermittelt (Colo205: 222 Gene, HT29: 47 Gene, SW480: 30 Gene). Anschließend wurden diese DEGs miteinander abgeglichen und 12 DEGs identifiziert, die in zwei oder allen drei Zelllinien konsistent dysreguliert waren. Mittels Kaplan-Meier (KM-) Überlebenszeitanalyse des Kolon-Adenokarzinom-Datensatz (COAD) des Krebsgenomatlas (The Cancer Genome Atlas, TCGA, PanCancer Atlas Datenset) wurden hieraus drei prognostisch relevante Gene (*TACSTD2*, *PERP* und *CAV2*) identifiziert, die sich signifikant mit kürzerem Überleben bei KRK assoziiert zeigten.

Diese Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen einer klinischen Studie (GSE62322) abgeglichen. In dieser Studie wurden von 21 Chemotherapie-naiven KRK-Patient*innen Tumorproben entnommen, worauf eine postoperative Chemotherapie mit FOLFIRI folgte. Um eine Gensignatur zu identifizieren, die das Ansprechen auf FOLFIRI vorhersagen soll, wurden im nächsten Schritt die Expressionsdaten der auf FOLFIRI ansprechenden Patient*innen mit denen der nicht auf FOLFIRI ansprechenden Patient*innen verglichen. Im Abgleich mit diesen Expressionsdaten konnten die drei Gene *TACSTD2*, *PERP* und *CAV2* nicht als signifikant dysreguliert bzw. als Teil der Gensignatur nachgewiesen werden. Jedoch konnten die Gene *SERPINE2* und *TNC* aus der Liste aller 284 DEGs in den klinischen Tumorproben ebenfalls als signifikant differentiell exprimiert nachgewiesen werden und mittels KM-Überlebenszeitanalyse als prognostisch relevant eingestuft werden. Diese drei bzw. fünf identifizierten Gene können nun Grundlage für weitere experimentelle Schritte sein, um neue diagnostische und prognostische Biomarker für die klinische Praxis zu etablieren.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
ATRX	ATP-dependent helicase ATRX
BH	Benjamini und Hochberg
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
CAV2	Caveolin-2
CH2-THF	5,10-Methylentetrahydrofolat
COAD	Colon adenocarcinoma
CPM	Counts per million
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
dTMP	Deoxythymidin- Monophosphat
dUMP	Deoxyuridin-Monophosphat
ECAD	E-Cadherin
EGFR	Epithelial growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale-Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FDR	False discovery rate
FdUMP	Fluorodeoxyuridin-Monophosphat
FdUTP	Fluorodeoxyuridin-Triphosphat
FOLFIRI	5-FU, Irinotecan, Leucovorin
FUTP	Fluorouridin-Triphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Gene Ontology
GSN	Gelsolin
KM	Kaplan-Meier
KRAS	Kirsten-rat-sarcoma-virus-oncogene
KRK	Kolorektalkarzinom
KRT17	Keratin 17
LV	Leucovorin
mKRK	metastasiertes Kolorektalkarzinom
MR4-Cancer	Master Regulator for Cancer
mRNA	messenger-RNA

NGS	Next Generation Sequencing
NK	Negativkontrolle
NRAS	Neuroblastoma RAS
OS	Overall survival
PANTHER	Protein annotation through evolutionary relationship
PCA	Principal component analysis
PERP	p53 apoptosis effector related to PMP22
PFS	Progression-free survival
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RAS	Rat sarcoma
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
SERPINE2	Serpin family E member 2
SOI	Sequence of interest
TACST2	Tumor associated calcium signal transducer 2
TCGA	The cancer genome atlas
TNC	Tenascin C
TYMS	Thymidylatsynthase
UICC	Union for International Cancer Control
UMI	Unique molecular identifier
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIM	Vimentin
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitstrahl der Chemotherapeutika-Entwicklung für die Behandlung des Kolorektalkarzinoms.....	12
Abbildung 2: Therapiealgorithmus Erstlinientherapie des mKRK.....	15
Abbildung 3: Normale Zellzyklusphasen am Beispiel der Colo205 P Positiv- und Negativkontrolle	31
Abbildung 4: Etablierung FOLFIRI-resistenter Zelllinien: IC50 Konzentration vor RNA-Sequenzierung.....	38
Abbildung 5: Positivkontrolle der Durchflusszytometrie nach 24h Inkubation mit 1µM Staurosporin	39
Abbildung 6: Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 96h FOLFIRI-Behandlung	40
Abbildung 7: Zellzyklusverteilung Colo205P und Colo205R	41
Abbildung 8: Zellzyklusverteilung Colo205P	41
Abbildung 9: Zellzyklusverteilung Colo205R.....	42
Abbildung 10: Colo205: Vergleich der Zellmorphologie	44
Abbildung 11: SW480: Vergleich der Zellmorphologie.....	44
Abbildung 12: qRT-PCR für die Gene <i>ECAD</i> , <i>VIM</i> und <i>TYMS</i>	45
Abbildung 13: Validierung einer vergleichbaren Genexpression vor RNA-Sequenzierung	47
Abbildung 14: Phred-Score am Beispiel der Zelllinie HT29	48
Abbildung 15: Inhalt pro Basensequenz am Beispiel von HT29R22.....	49
Abbildung 16: GC-Verteilung der Sequenzierungsbibliothek am Beispiel von HT29R22.....	49
Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse der einzelnen Zelllinien.....	53
Abbildung 18: PCA aller Zelllinien.....	53
Abbildung 19: Venn-Diagramm der DEGs der Zelllinien Colo205, HT29 und SW480	54
Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für <i>TACSTD2</i> , <i>PERP</i> und <i>CAV2</i>	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des KRK nach UICC	13
Tabelle 2: PCR-Reaktionsgemisch für die Mikrosatellitenamplifikation.....	25
Tabelle 3: PCR-Cycling Programm für die Mikrosatellitenamplifikation.....	25
Tabelle 4: Verwendete FOLFIRI Behandlungskonzentrationen	26
Tabelle 5: Verdünnungsreihe zur IC50-Bestimmung.....	27
Tabelle 6: Reaktionsgemisch für die Reverse Transkription (RT)	28
Tabelle 7: Inkubationsprotokoll für Reverse Transkription.....	29
Tabelle 8: Reaktionsmix für die RT-qPCR	29
Tabelle 9: Reaktionsprotokoll RT-qPCR	30
Tabelle 10: IC50 _P FOLFIRI-Volumina des Apoptose Assays	32
Tabelle 11: Propidiumiodidfärbelösung für die Durchflusszytometrie.....	32
Tabelle 12: IC50 Konzentrationen von Colo205, HT29, SW480 und ihrer resistenten Subzelllinien.....	38
Tabelle 13: IC50 Konzentrationen der jeweiligen parentalen Zelllinien	39
Tabelle 14: Veränderungen der Zellzyklusverteilung nach FOLFIRI Behandlung	40
Tabelle 15: Durchflusszytometrie nach 96h FOLFIRI-Behandlung	42
Tabelle 16: LogFC und p-Werte der übereinstimmenden DEGs.....	55
Tabelle 17: Ergebnisse der Genontologie-Analyse mit PANTHER und der Gendatenbank GeneCards	56
Tabelle 18: Ergebnisse der funktionellen Genset-Anreicherungsanalyse mittels GSEA unter Verwendung der „Hallmark“ Datensätze.....	57
Tabelle 19: Ergebnisse der funktionellen Genset-Anreicherungsanalyse der DEGs: Signifikante Hochregulierung zweier Gensets bei HT29	58
Tabelle 20: Ergebnisse der Limma-Analyse für die Gene GSN, TACSTD2 und PERP	60
Tabelle 21: Limma-Analyse der Expressionsdaten des Datensets GSE62322 der 98 DEGs der Zelllinien.....	61
Tabelle 22: Genontologie-Analyse mit PANTHER und der Gendatenbank GeneCards ...	61
Tabelle 23: Limma-voom Analyse (Galaxy) für SERPINE2 und TNC	62
Tabelle 24: Übersichtstabelle: KM-Überlebenszeitanalyse und Expressionsanalyse	63

1. Einleitung

1.1 Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKRK)

Obwohl sich Prävention, Früherkennung und Behandlung in der letzten Dekade erheblich verbessert haben, ist das Kolorektalkarzinom (KRK) der dritthäufigste Tumor bei Männern und der zweithäufigste Tumor bei Frauen. In 2020 war das KRK die Tumorerkrankung mit der dritthöchsten Zahl an Neuerkrankungen und global hinter Lungenkarzinomen die zweithäufigste krebbsbedingte Todesursache (9.4% aller krebbsbedingten Todesfälle) (Sung et al., 2021; Young et al., 2014).

Inzidenz und Mortalität zeigen einen gegensätzlichen Trend in der Altersverteilung: Von 2014 bis 2018 ist die Inzidenzrate bei Menschen ab 50 Jahren um etwa 2 % pro Jahr gesunken, während sie bei Erwachsenen unter 50 Jahren um 1.5 % pro Jahr gestiegen ist. Ähnlich verhielt es sich mit der Mortalitätsrate: Diese sank in der letzten Dekade (2010-2019) um ca. 2% pro Jahr bei über 50-Jährigen, während sie bei Erwachsenen unter 50 Jahren in den Jahren 2005-2019 um 1.2% pro Jahr anstieg (Siegel et al., 2021, 2022; Sung et al., 2021).

Spezifische zugrundeliegende Kausalfaktoren für den Anstieg der Inzidenz bei jüngeren Erwachsenen seit Mitte der 1990er-Jahre sind nicht bekannt, da die Erkenntnisse über Risikofaktoren derzeit fast ausschließlich auf Daten älterer Patientenkohorten beruhen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der Wandel des Lebensstils, mit Beginn der Generation geboren in den 1950er-Jahren, hin zu einem höheren Fleischkonsum, geringer körperlicher Aktivität einhergehend mit höherem Körpergewicht ein bedeutender Einflussfaktor ist. Dies kann in vielen Länder Osteuropas, Südost- und Zentralasiens und Südamerikas beobachtet werden. Dort geht die sozioökonomische Weiterentwicklung mit einer stetig ansteigenden Inzidenzrate von KRK einher, sodass die KRK-Inzidenz als Surrogatparameter für die sozioökonomische Entwicklung eines Landes betrachtet werden kann (Siegel et al., 2022; Sung et al., 2021).

Die hohe Mortalität lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass fast die Hälfte aller KRK-Patienten – einschließlich ~25% der Patienten mit Lymphknoten-negativer, nicht-metastasierter Stadium I und II Erkrankung – ein Tumorrezidiv entwickeln (Kumbrink et al., 2021; Young et al., 2014). Dieser limitierte Behandlungserfolg lässt sich insbesondere auf die Resistenzentwicklung sowohl gegen die klassischen Chemotherapeutika als auch gegen die zielgerichteten Medikamente zurückführen (Modest et al., 2018; Van Cutsem et al., 2016). Die 5-Jahres Überlebensrate für metastasiertes KRK (mKRK) beträgt trotz der

Fortschritte in molekularpathologischer Diagnostik und Staging, verbesserter Operationstechniken und neu-etablierter neoadjuvanter und adjuvanter Therapieoptionen nur ~ 14% (American Cancer Society, 2017). Dies macht deutlich, dass die Aufklärung von Mechanismen der KRK-Progression und der Therapieresistenz global relevant sind und unterstreicht die Notwendigkeit neue prädiktive Marker und potenzielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren (Kumbrink et al., 2021).

1.2 Therapie des Kolorektalkarzinoms

1.2.1 Chemotherapeutika und deren molekulare Wirkmechanismen

Das erste Chemotherapeutikum, welches für die Behandlung von KRK eingesetzt wurde, ist 5-Fluoruracil (5-FU), ein Uracil-Analogon mit einem Fluor-statt einem Sauerstoff-Atom in der C5 Position (Abbildung 1). 5-FU wird intrazellulär zu den drei aktiven Metaboliten Fluorodeoxyuridin-Monophosphat (FdUMP), Fluorodeoxyuridin-Triphosphat (FdUTP) und Fluorouridin-Triphosphat (FUTP) umgesetzt und beeinflusst RNA- und DNA-vermittelte Prozesse (Gmeiner, 2020; Gustavsson et al., 2015):

Für die direkten zytotoxischen Effekte auf maligne Zellen sind die 5-FU Desoxyribunukleotid-Moleküle FdUMP und FdUTP verantwortlich. FdUMP ist ein potenter Inhibitor der Thymidylatsynthase (TYMS). Diese setzt unter Verwendung von 5,10-Methylen tetrahydrofolat (CH₂-THF) als Methylgruppenspendor Deoxyuridin-Monophosphat (dUMP) zu Deoxythymidin-Monophosphat (dTMP) um. Die TYMS-Inhibition durch Bildung eines ternären Komplexes mit FdUMP führt zur Dysbalance im Desoxynukleotid-Pool der Zelle. Dieser Replikationsstress wird zusätzlich durch den fälschlichen Einbau von FdUTP in die DNA verschärft, was zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt. Zusätzlich wird der Metabolit FUTP in RNA eingebaut und zerstört die normale Prozessierung und Funktion aller RNA-Formen (Gmeiner, 2020; Longley et al., 2003).

Indem Leucovorin (LV, entspricht Folinsäure) die intrazelluläre Konzentration von CH₂-THF erhöht, verstärkt es die Zytotoxizität von 5-FU erheblich (Longley et al., 2003). Die Ansprechrate und das progressionsfreie Überleben (progression-free survival, PFS) verbesserte sich signifikant durch die Kombination von 5-FU mit Leucovorin (Abb.1) (Petrelli et al., 1987; Poon et al., 1989).

Anfang der 2000-er Jahre wurde die KRK-Therapie durch die Einführung von Irinotecan und Oxaliplatin wesentlich verbessert.

Irinotecan (auch bekannt als CPT-11) ist eine Carbamat-Ester Vorstufe von SN-38. *In vivo* wird das Prodrug von Carboxylesterasen in der Leber sowie normalem Darmgewebe zu seinem aktiven Metaboliten SN-38 hydrolysiert (Rivory, 2000). Voraussetzung für die Transkription ist die Entspiralisierung der abzulesenden DNA-Abschnitte. Um den

Torsionskräften auf die angrenzenden DNA-Abschnitte entgegenzuwirken, führt das Enzym Topoisomerase I während der DNA-Replikation vorübergehende Einzelstrangbrüche in den angrenzenden DNA-Abschnitten durch. Durch die Spaltung können diese DNA-Abschnitte entspiralisiert werden (Hsiang et al., 1989; Li & Liu, 2016).

Irinotecan stabilisiert die Topoisomerase I-DNA-Komplexe. Es kommt infolgedessen zu DNA-Doppelstrangbrüchen, wenn die Replikationsgabeln und der Topoisomerase-I-Komplex kollidieren. Die Doppelstrangbrüche führen entweder durch Apoptose oder durch Nekrose zum Zelltod (Hsiang et al., 1985; Hsiang et al., 1989).

Das Platin-Derivat Oxaliplatin ruft DNA- und RNA-Schäden hervor, unter anderem durch Bildung von DNA-Strang-Querverbindungen, das Anhalten der DNA- und messenger-RNA (mRNA)-Synthese und durch das Auslösen von immunologischen Reaktionen. Im Gegensatz zu Cisplatin wirkt es effektiv bei KRK (Alcindor & Beauger, 2011).

Anschließend untersuchten viele Studien die Kombination der Chemotherapeutika: Längeres PFS und Gesamtüberleben (overall survival, OS) wurde durch die Kombinationsregime 5-FU/LV plus entweder Irinotecan (FOLFIRI) oder plus Oxaliplatin (FOLFOX) erreicht (Colucci et al., 2005; Goldberg et al., 2004; Saltz et al., 2000).

Für die Kombination 5-FU/LV plus Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFOXIRI) konnte im Vergleich mit FOLFIRI zwar ein längeres PFS und OS nachgewiesen werden, aber auch eine deutliche Zunahme der Toxizität in Form von peripherer Neurotoxizität und Neutropenie (Falcone et al., 2007).

Die nächste entscheidende Weiterentwicklung war die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab (Avastin®). Dieser inhibiert die Angiogenese durch Bindung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF). In der maßgeblichen Phase-III Zulassungsstudie konnte bei Kombination von Bevacizumab mit FOLFIRI ein signifikant besseres Ansprechen erzielt werden (Gustavsson et al., 2015; Hurwitz et al., 2004).

Der epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor (epithelial growth factor receptor, EGFR) ist eine weitere Zielstruktur für die Therapie von EGFR-positiven KRKs, die keine Mutation in den RAS (rat sarcoma)-Genen (KRAS (Kirsten-RAS-virus) und NRAS (Neuroblastoma RAS) Wildtyp (WT)) aufweisen. Bisher sind die zwei monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Panitumumab zugelassen.

Die FIRE-3 Studie verglich die Erstlinienbehandlung FOLFIRI plus Bevacizumab mit FOLFIRI plus Cetuximab bei Patienten mit mKRK mit WT-KRAS Expression. Es zeigte sich ein signifikanter Vorteil von FOLFIRI plus Cetuximab in Bezug auf medianes Überleben, objektives Ansprechen und Häufigkeit der Tumorverkleinerung (Stintzing et al., 2016).

Die spätere Überlebenszeit- und Per-Protokoll Analyse der FIRE-3 Studie ergab, dass nur die Patienten mit linksseitigen Tumoren von FOLFIRI plus Cetuximab hinsichtlich Ansprechen und Gesamtüberlebenszeit profitierten (Heinemann et al., 2021).

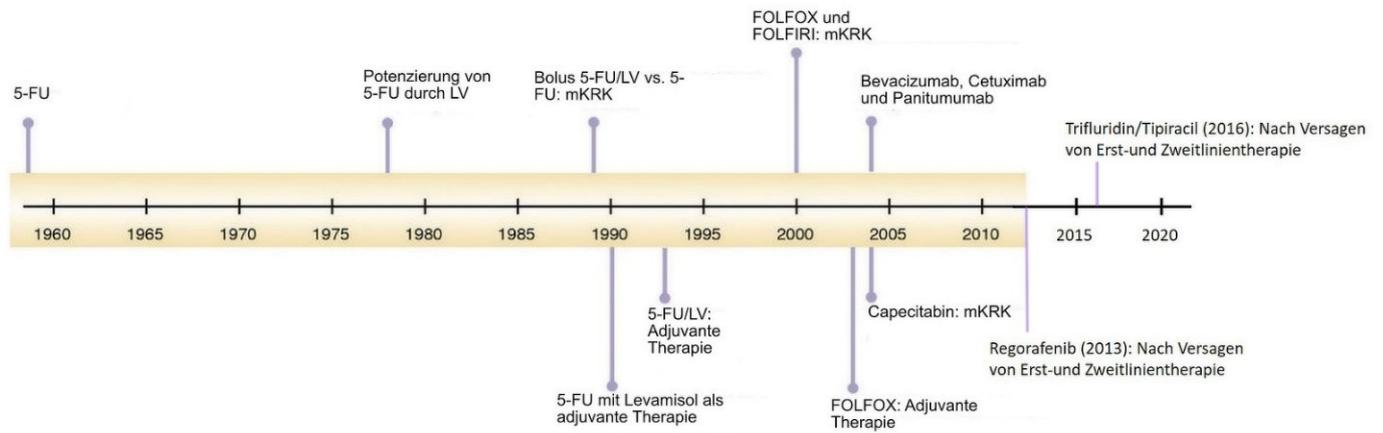


Abbildung 1: Zeitstrahl der Chemotherapeutika-Entwicklung für die Behandlung des Kolorektalkarzinoms
 Angepasste Abbildung von Gustavsson et al. (2015)

1.2.2 Aktuelle Therapie des metastasierten Kolorektalkarzinoms

In Deutschland legen die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), die Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und die Deutsche Krebshilfe e.V. in der „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“ (Langversion 2.1 -Januar 2019) die optimale Diagnostik- und Behandlungsstrategie fest:

Eine endoskopische Resektion ist für gutartige Adenome, Tumore *in situ* – ohne Überschreitung der Lamina muscularis mucosae – und Tumore ohne Überschreitung der Subserosa ausreichend (Stadium 0 und I, s. Tabelle 1; TNM-Klassifikation des KRK s. Anhang Supplementäre Tabelle 1). Eine radikale chirurgische Resektion soll ab einer Hochrisiko-Situation – wenig differenzierte Tumore und/oder Lymphgefäßinfiltration – in Stadium I erfolgen. Die adjuvante Chemotherapie nach chirurgischer Resektion kann ab Stadium II erfolgen, ab Stadium III ist sie obligat.

Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms der UICC		
KRK-UICC-Stadium		TNM
0		TIS/CIS (Carcinoma <i>in situ</i>)
I		Bis T2, N0, M0
II	IIA	T3, N0, M0
	IIB	T4a, N0, M0
	IIC	T4b, N0, M0
III	IIIA	Bis T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
	IIIB	T3/T4, N1, M0 oder T2/T3, N2a, M0 oder T1/T2, N2b, M0
	IIIC	T4a, N2a, M0 oder T3/T4a, N2b, M0 oder T4b, N1/N2, M0
IV	IVA	Jedes T, jedes N, M1a
	IVB	Jedes T, jedes N, M1b
	IVC	Jedes T, jedes N, M1c

Tabelle 1: Stadieneinteilung des KRK nach UICC

Entnommen und adaptiert vom Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft (2019); TNM = Tumor, Nodus, Metastase; UICC = Union for International Cancer Control

Das metastasierte KRK entspricht dem UICC Stadium IV. In der S3-Leitlinie werden drei Entscheidungsebenen definiert, um je nach klinischer Situation die optimale Erstlinientherapie zu wählen:

1. Der Allgemeinzustand des Patienten, ob eine intensivierete Chemotherapie möglich ist.
2. Die Lokalisation und Ausdehnung des Tumors zur Beurteilung der Resektabilität.
3. Die Molekularbiologie des Tumors, um die passende zielgerichtete Behandlung zu finden.

Diese Analyse erfolgt vor Einleitung der Erstlinientherapie und umfasst die Untersuchung des Mutationsstatus der RAS -Gene KRAS und NRAS, des BRAF (proto-oncogene B-Raf) -Gens sowie die Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität. Zusätzlich soll vor Beginn einer Fluoropyrimidin-Therapie ein Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD)-Mangel ausgeschlossen werden, um eine lebensbedrohliche Toxizität für den Patienten zu vermeiden. Die DPD ist das Schlüsselenzym für den 5-FU-Abbau und inaktiviert > 80% des verabreichten 5-FU.

Behandlungsstrategien abhängig vom klinischen Allgemeinzustand (Abbildung 2) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019):

Bei gutem Allgemeinzustand sind die Patienten*innen für eine intensive Therapie geeignet. Es wird eine maximale Tumorreduktion angestrebt. Im ersten Schritt wird hier zwischen resektabler und nicht-resektabler Erkrankung unterschieden und die Prognose des/-r Patienten/-in für ein längeres krankheitsfreies Intervall oder Heilung beurteilt. Bei guter Prognose und resektabler Erkrankung wird die primäre Metastasenresektion empfohlen. Bei ungünstiger Prognose, oder nicht-resektabler Metastasierung soll eine primär systemische Tumorthherapie erfolgen. Zu den am häufigsten verwendeten Chemotherapieschemata zählen FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI und XELOX (orales Fluoropyrimidin plus Oxaliplatin). Diese werden mit den zielgerichteten Substanzen (anti-EGFR oder anti-VEGF) in Abhängigkeit von dem molekularpathologischen Status sowie der Tumorlokalisierung kombiniert.

Bei reduziertem Allgemeinzustand erfolgt ebenfalls die Unterscheidung zwischen primär resektabler und nicht-resektabler Erkrankung. Bei primär-resektabler Erkrankung ist das Ziel die Therapiefähigkeit wiederherzustellen. Als sogenannte „Überbrückungs-Therapie“ werden Fluoropyrimidin-Monotherapien in Kombination mit Bevacizumab eingesetzt. Bei RAS-WT Status ist eine Mono- anti-EGFR Therapie möglich. Bei nicht-resektabler Erkrankung soll eine palliative, symptomatische Therapie erfolgen. Möglich sind hierbei die

Therapie mit einem Fluoropyrimidin plus Bevacizumab, eines der o.g. Chemotherapieschema mit reduzierter Dosis oder die anti-EGFR-Monotherapie bei RAS-WT Tumoren im linken Kolon.

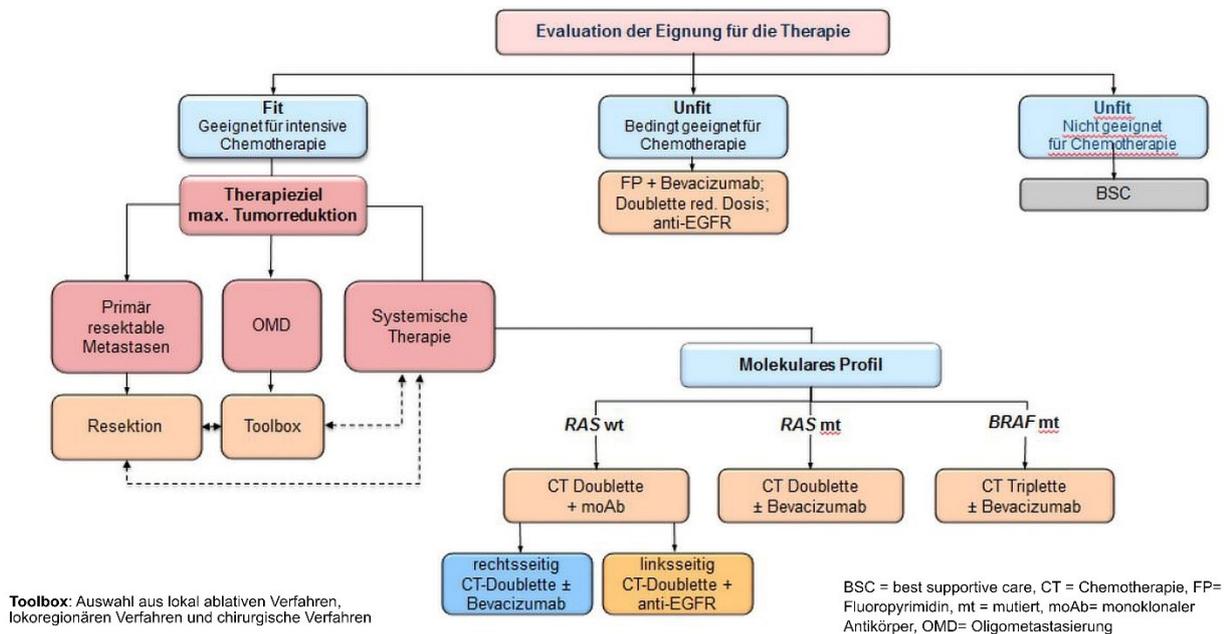


Abbildung 2: Therapiealgorithmus Erstlinientherapie des mKRK

Lokal ablative Verfahren: Thermoablation, Strahlentherapie, Elektroporation; Lokoregionäre Verfahren: Intraarterielle Chemotherapie der Leber (HAI), Selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT), Zytoreduktion mit hyperthermer Chemotherapie (HIPEC); entnommen und adaptiert aus Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft (2019)

Bei Nicht-Ansprechen werden in der Zweitlinientherapie Erstlinientherapeutika verwendet, die nicht bereits bei der Erstbehandlung des/-r Patienten/-in eingesetzt wurden. Für spätere Therapielinien sind der Multikinase-Inhibitor Regorafenib (Stivarga®) und das Nukleosid-Analogon/Thymidinphosphorylase Inhibitor-Präparat TAS-102 (Trifluridin/Tipiracil, Lonsurf®) zugelassen.

Das Auftreten von Nebenwirkungen ist bei diesen Therapieregimen deutlich häufiger, zugleich ist die Effektivität erheblich geringer (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Daher ist die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten von größter Relevanz.

1.2.3 Primäre und sekundäre Chemotherapieresistenz

Obwohl die aufgezeigten multimodalen Behandlungsstrategien die Ansprech- und Überlebensrate erheblich verbessert haben, stellt Tumorprogression aufgrund von Therapieresistenz ein großes Problem in der KRK-Therapie dar. Aufgrund von Keimbahn-Polymorphismen und den unterschiedlichen somatischen Tumormerkmalen und -mutationen besteht eine große interindividuelle Heterogenität der Therapieergebnisse mit einer hohen Rate primärer und erworbener Chemotherapieresistenz (De Mattia et al., 2015).

Als primäre (oder *de novo*) Resistenz wird die stochastisch auftretende, intrinsische Resistenz bei unbehandelter Tumorerkrankung bezeichnet. Die erworbene (oder sekundäre) Resistenz bezieht sich auf die Mutations- und Adaptationsfähigkeit der Zellen, die sich unter dem Selektionsdruck des chemotherapeutischen Zellstress mit transkriptomischen sowie epigenetischen Veränderungen anpassen (Molinari et al., 2018; Russo et al., 2019; Sharma et al., 2017). Bei anhaltendem Selektionsdruck kann es zu Mutationen in klinisch relevanten Genen kommen.

Ein Beispiel hierfür ist die Resistenzentwicklung von Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (NSCLC): Bei NSCLC können bei Nachweis einer aktivierenden EGFR-Mutation oral verfügbare EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) appliziert werden. Trotz initial deutlichem Ansprechen entwickelt sich bei fast allen Patient*innen innerhalb eines Jahres eine erworbene Resistenz. Es konnten in vorausgegangenen Studien mehrere Mechanismen und potentielle Faktoren aufgedeckt werden, welche die EGFR-TKI-Resistenz vermitteln. Ein wesentlicher Mechanismus sind die EGFR^{T790M}-Mutationen (Suda et al., 2012; Suda et al., 2015). Für diese zeigten Hata et al. (2016) im Zelllinienmodell, dass diese entweder durch Selektion von EGFR^{T790M}-positiven Klonen oder durch genetische Veränderungen von initial EGFR^{T790M}-negativen, chemotherapie-sensitiven Zellen entstehen können.

Die Folge der Behandlungsresistenz ist die erneute Tumorprogression (Hata et al., 2016), was die Überlebensrate der Patient*innen deutlich begrenzt (Suda et al., 2012).

Resistenz gegen die konventionellen Chemotherapeutika sowie die zielgerichteten Therapeutika wurden bisher mit einer Vielzahl von Faktoren und Mechanismen in Verbindung gebracht:

Genetische Polymorphismen, welche zu Veränderungen der entsprechenden Genexpression führen, werden mit Resistenz gegen 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin in Verbindung gebracht. Als Beispiele führen De Mattia et al. (2015) genetische Varianten der Transmembran-Transporter ABC (ATP-binding cassette)-Superfamilie und der SLC (solute

carrier)-Membranproteine bei Irinotecan-Resistenz, veränderte Genexpression und Enzymaktivität der MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolat- Reduktase) und der Thymidylatsynthase (TYMS) bei Fluoropyrimidin-Resistenz, Veränderungen im Medikamentenmetabolismus bei Irinotecan- und Oxaliplatin-Resistenz und transkriptomische Veränderungen im DNA-Nukleotid-Reparatursystem bei Oxaliplatin-Resistenz an.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten vorwiegend transkriptomischen Anpassungen wird die Behandlungsresistenz gegen zielgerichtete Therapien mit Veränderungen auf der genomischen und transkriptomischen Ebene erklärt. Es wurden bereits zahlreiche Mechanismen aufgeklärt, die die Effektivität von anti-EGFR-Therapien beeinflussen.

Beschrieben sind unter anderem alternative Aktivierungen des EGFR/MAPK (mitogen-activated-protein kinase) -Signalwegs durch EGFR-Amplifikation und -Mutation (Balak et al., 2006). KRAS, NRAS, BRAF und PIK3CA -Mutationen im nachgeschalteten Signalweg führen ebenfalls zur Cetuximab-Resistenz (De Roock et al., 2010; Karapetis et al., 2008). Auch bei Amplifikation oder Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2) und MET (MET Proto-Oncogene) können Tumorzellen den pharmakologisch geblockten EGFR-Signalweg umgehen (Misale et al., 2014).

Darüber hinaus kann die Aktivierung kompensatorischer Signalwege für Therapieresistenz verantwortlich sein. Wie Kapoor et al. (2014) im Mausmodell zeigten, kann die Amplifikation und Überexpression von Yap1/Tea2 (Yes1 associated transcriptional regulator/TEA domain transcription factor 2) den Verlust von KRAS-vermittelter Signalübertragung kompensieren.

Die meisten der hier beispielhaft hervorgehobenen Resistenzmechanismen können sowohl als primäre als auch als erworbene Resistenz auftreten (Misale et al., 2014).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die molekulare Heterogenität des kolorektalen Karzinoms, welche bei Metastasierung nachweislich noch stärker ausgeprägt ist, ein zentraler Grund für Therapieresistenz und den eingeschränkten Behandlungserfolg ist (Lee et al., 2014; Misale et al., 2014; Vermaat et al., 2012).

1.3 Genexpressionssignaturen als Biomarker

Eine Alternative zu den konventionellen Prognosefaktoren und Biomarkern sind Gen-Prognose-Signaturen, die durch Genexpressionsanalysen von mRNA ermittelt werden. Sie bieten nachweislich eine zuverlässigere Grundlage für die Prognoseabschätzung sowie für

eine individualisierte und effektivere Therapie (Lee et al., 2013; Sun et al., 2015; Zuo et al., 2019).

Bei Brustkrebs konnte bereits durch den Einsatz von Microarray-Technologien der MammaPrint® -Prognosetest (Agendia Inc., Amsterdam, Niederlande) entwickelt werden, der von der FDA (Food and Drug Administration, US-Arzneimittelbehörde) zugelassen ist und in Deutschland seit 2021 von den Krankenkassen rückerstattet wird (Agendia, 2021; Glas et al., 2006; van 't Veer et al., 2002).

In zahlreichen Arbeiten wurden mRNA-Signaturen entdeckt, um bei KRK einerseits die Prognose (Gentles et al., 2015; Guinney et al., 2015) wie auch das Therapieansprechen auf die Einzelsubstanzen oder die Kombinationsregime präziser vorhersagen zu können (Chen et al., 2020; Jensen et al., 2015; Song et al., 2018; Watanabe et al., 2011).

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Eine Studie, die eine Resistenz-Gensignatur sowie den molekularen Resistenzmechanismus gegen das Kombinationsregime FOLFIRI untersucht und die Bedeutung der Signaturgene für das Patientenüberleben ermittelt, fehlt bisher. Diese Doktorarbeit soll dies ergänzen und als erster Ansatz einer explorativen, hypothesengenerierenden Analyse gelten.

Es wurde nach folgendem Ansatz vorgegangen: Zunächst erfolgte die Generierung FOLFIRI-resistenter KRK-Subzelllinien, abstammend aus den humanen KRK- Zelllinien Colo205, HT29 und SW480. Es folgte ein Vergleich der Morphologie, des Zellzyklus und der Genexpression. Hierbei wurden sowohl die Veränderungen zwischen parentalem und resistentem Äquivalent beurteilt als auch die Unterschiede zwischen den Zelllinien. Mittels Next-Generation Sequencing (NGS) wurden die Zelllinien auf relevante Mutationen auf DNA-Ebene untersucht bevor dann die Analyse der Transkriptome mittels RNA-Sequenzierung erfolgte. Mittels biostatistischer Datenanalyse konnte eine zelluläre Gensignatur ermittelt werden, welche dann mit Expressionsdaten klinischer Datensätze verglichen wurde. Die hier gefundenen übereinstimmenden Gene wurden im Zusammenhang mit wissenschaftlichen Studien und aktueller Literatur sorgfältig evaluiert.

Eine solche Gensignatur soll in Zukunft die Vorhersage für das Ansprechen von mKRK-Patient*innen auf FOLFIRI erleichtern und somit die Erstellung eines personalisierten und effektiveren Therapieregimes verbessern, welches den Patient*innen ein längeres Gesamtüberleben ermöglichen kann.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Zellkultur	
Agarose gel 2% für den Mycoplastmatest	Thermo Fisher Scientific™
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich®
Destilliertes sterilisiertes Wasser	Ambion, Life Technologies™
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich®
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom GmbH
GeneScan 500LIZ Größenstandard	Applied Biosystems®
HiDi Formamid für die STR Analyse	Applied Biosystems®
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich®
Penicillin-Streptomycin 1%	PAN-Biotech GmbH™
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN-Biotech GmbH™
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02%)	PAN-Biotech GmbH™
Trypan Blau	Sigma-Aldrich®
5-Fluoruracil 50mg/ml	Krankenhausapotheke des Klinikum Großhadern, München
Irinotecan 10mg/ml	
Leucovorin 20mg/ml	
Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	
dNTP Mix, 10 mM jeweils für die RT-PCR	Thermo Fisher Scientific™
Primer (random hex) für die RT-PCR	Thermo Fisher Scientific™
Probe Master für qPCR	Roche Life Science®
Reaktionspuffer für die Reverse Transkription, 5x	Fermentas GmbH, Thermo Fisher Scientific™
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific™
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific™
UPL Universal ProbeLibrary	Roche Life Science®
IC50 Bestimmung	
alamarBlue®	Bio-Rad Laboratories
Apoptose Assay	
Ethanol (100%)	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH

Propidiumiodid 1mg/ml	Sigma-Aldrich®
RNase A	Sigma-Aldrich®
Staurosporin 1µM	ImmunoChemistry Technologies
Triton X-100 20%	Sigma-Aldrich®
Tris-HCL (Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid) 1M	Carl Roth GmbH
RNA Sequenzierung	
Agencourt AMPureXP	Beckman Coulter Diagnostics
Agilent High sensitivity DNA-Chips	Agilent Technologies, Inc.
DNA Clean & Concentrator™	Zymo Research GmbH
dNTPs	Thermo Fisher Scientific™
EDTA 0.5M	Sigma-Aldrich®
Exonuclease I	New England BioLabs Inc.®
KAPA HiFi ReadyMix	Roche Life Science®
Maxima H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific™
NaOH	Merck®
UltraPure DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific™

3.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
6,12,24- Lochplatten	Corning, Inc. ®
96- Lochplatten	TPP™
Eppendorf 1.5/2ml Röhrchen	Eppendorf®
Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml	TPP™
LightCycler® 480 Dichtungsfolie	Roche Life Science®
LightCycler® 96-Lochplatten für qPCR	Roche Life Science®
Nitril Xtra Handschuhe	Kimberly-Clark, Kimtech Science™
Pipettenfilteraufsätze 1000µl, 100µl, 10µl, 2.5 µl	Biozym Scientific GmbH
Stripetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, Inc. ®
Zellkulturflaschen T25, T75, T150	Corning, Inc. ®

3.3 Geräte

ABI3130 Sequenzierer	Applied Biosystems®
Accuri C6 Flow Zytometer	Becton & Dickinson
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
Axiovert 200 Phasenkontrast-Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Countess II Zellzähler	Thermo Fisher Scientific™
Handystep's electronic	BrandTech Scientific Inc.®
Illumina HiSeq1500 Sequenzierer	Illumina®
Ion Gene Studio S5 Prime	Thermo Fisher Scientific™
Laminarströmungsabzug HeraSafe Heraeus type HS12	Thermo Fisher Scientific™
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific™
Objekträger für die Zählkammer	Thermo Fisher Scientific™
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH
Qubit 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific™
Research plus single-channel Pipetten (1000µl, 100µl, 10µl, 2.5µl)	Eppendorf®
Shaker D05-10L	neoLab Migge GmbH
Table top centrifuge 3-1810	neoLab Migge GmbH
Thermomixer comfort	Eppendorf®
Varioskan Photometer	Thermo Fisher Scientific™
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc
Zellkulturinkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific™
Zentrifuge 5417R, 5424	Eppendorf®
Zentrifuge Megafuge 8R	Thermo Fisher Scientific™

3.4 Kits

Experion™ RNA StdSens Analyse-Kit	Bio-Rad Laboratories
Multiplex PCR Kit	QIAGEN®
Nextera® XT DNA-Library- Preparation Kit	Illumina®

PCR Mycoplasma Test Kit	AppliChem GmbH
Qiagen DNA mini kit	QIAGEN®
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific™
RNeasy Mini Kit	QIAGEN®

3.5 Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Zelltyp	Nummer
Colo205	Homo sapiens	Adenocarcinoma; Colorectal; Klassifikation nach Dukes: D	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures)
HT29	Homo sapiens	Adenocarcinoma; Colorectal; Klassifikation nach Dukes: C	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
SW480	Homo sapiens	Adenocarcinoma; Colorectal; Klassifikation nach Dukes: B	DSMZ
HEK293T	Homo sapiens	Human Embryonic Kidney	DSMZ

3.6 Primer für RT-qPCR

Name	UPL	Konz.	Sequenz	Hersteller
<i>ECAD</i> F	#35	300nM	5'-CCCGGGACAACGTTTATTAC-3'	Biomers.net
<i>ECAD</i> R	#35	600nM	5'- GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC-3'	Biomers.net
<i>VIM</i> F	#13	900nM	5'-TACAGGAAGCTGCTGGAAGG-3'	Biomers.net
<i>VIM</i> R	#13	600nM	5'-ACCAGAGGGAGTGAATCCAG-3'	Biomers.net
<i>TYMS</i> F	#43	900nM	5' CCCAGTTTATGGCTTCCAGT-3'	Biomers.net
<i>TYMS</i> R	#43	600nM	5' GCAGTTGGTCAACTCCCTGT-3'	Biomers.net
<i>GAPDH</i> F	#60	300nM	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	Biomers.net
<i>GAPDH</i> R	#60	300nM	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	Biomers.net

3.7 Software

Software	Firma
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad Laboratories
cBioPortal for Cancer Genomics V.4.1.14	Center for Molecular Oncology at Memorial Sloan Kettering Cancer Center
DB Accuri C6 Analyse Software	Becton Dickinson
Galaxy	Galaxy Europe LAFUGA Galaxy Server (Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München)
Gene expression omnibus (GEO)	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Gene set enrichment analysis (GSEA) V.4.1.0	Broad Institute, Inc., Massachusetts Institute of Technology, and Regents of the University of California.
Office	Microsoft
PANTER V.17.0	PANTHER GeneOntology http://www.pantherdb.org/
Prism GraphPad 5 und 9	GraphPad
R 4.0.2	R project
TCGA	National Cancer Institute (NCI)
Varsome	The VarSome platform

4. Methoden

4.1 Zellkultur und Etablierung der FOLFIRI-Resistenz

Die drei Darmkrebszelllinien Colo205, HT29 und SW480 wurden über die European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) sowie über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Identität aller Zelllinien wurde mittels Short Tandem-Repeat Analyse verifiziert, siehe unten. Alle Zellen wurden regelmäßig mittels des PCR Mycoplasma Kits (Applichem®) zum Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination getestet. Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10%igem FBS (Fetales bovines Serum) und 1%igem Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep.) bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 80% in 25cm², 75cm² oder 150cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

Dreimal pro Woche wurden abhängig von der Konfluenz das Medium gewechselt oder, um Überwuchern zu verhindern, 10-20% der Zellen in eine neue Zellkulturflasche übernommen: Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt, die Zellen wurden mit angewärmter phosphatgepufferten Salzlösung (Phosphatbuffered saline, PBS) gewaschen und mithilfe von Trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) von der Flasche abgelöst. Im Anschluss wurde das Trypsin mit dem FBS-haltigen Medium neutralisiert. Es wurden 10-20% des zellhaltigen Gemisches in ein Zentrifugenröhrchen übernommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellsediment wurde in frischem FBS-haltigem Medium resuspendiert und in eine frische Zellkulturflasche überführt.

Die Zellkulturexperimente wurden mit technischen und biologischen Replikaten durchgeführt. Um ausreichend Zellen in vergleichbaren Selektionsstadien für die Experimente zur Verfügung zu haben, wurde eine große Zahl an Zellen angereichert und die Zellen anschließend in mehreren Vorratsgefäßen zunächst bei -80°C und danach in Flüssigstickstoff eingefroren. Zum Einfrieren wurde eine Lösung aus 90%igem FBS und 10%igem DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet.

STR Analyse

Die Identität aller Zelllinien wurde mittels Short Tandem-Repeat Analyse verifiziert. Die genomische DNA wurde mittels des Qiagen DNA mini Kits (QIAGEN®) nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die folgenden Mikrosatelliten Loci wurden mittels Multiplex-PCR amplifiziert: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO und Amelogenin (Dirks & Drexler, 2013).

Für die Amplifikation wurde das Multiplex PCR Kit (QIAGEN®) nach Angaben des Herstellers verwendet. Im ersten Schritt wurde der in Tabelle 2 aufgeführte PCR-Mix hergestellt. 9µl des PCR-Reaktionsgemischs plus 1µl DNA wurden vorsichtig in sterile Reaktionsgefäße gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde kurz zentrifugiert und im Anschluss nach in Tabelle 3 gezeigtem Protokoll inkubiert.

100ng der Zelllinien-DNA	1µl
RNase-freies H ₂ O	3µl
2x QIAGEN multiplex PCR Master Mix* *enthält HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Puffer, dNTP Mix	5µl
Primer Mix, 10x (jeder Primer mit 2µM)	1µl

Tabelle 2: PCR-Reaktionsgemisch für die Mikrosatellitenamplifikation

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1x	95°C	15 min
50x	94°C	30s
	59.5°C	90s
	72°C	60s
1x	60°C	30min
1x (Aufbewahrung)	4°C	∞

Tabelle 3: PCR-Cycling Programm für die Mikrosatellitenamplifikation

Für die Analyse auf dem genetischen Analysator ABI3130 (Applied Biosystems®) wurde die Grundmischung aus 18,5µl HiDi Formamide und 0,5µl DNA GeneScan 500 LIZ Größenstandard hergestellt. Zu 19µl dieser Mischung wurde 1µl der PCR-Produkte gegeben. Die amplifizierten Fragmente wurden dann auf dem genetischen Analysator ABI3130 mittels Kapillarelektrophorese geprüft und im Anschluss mit dem GeneMapper 4.0 und dem Cellosaurus STR similarity search tool (CLASTR: <https://web.expasy.org/cellosaurus-str-search/>) in ihrer Identität bestätigt.

Etablierung der Chemotherapie-Resistenz

Für die Herstellung der resistenten Äquivalente wurden die sensitiven Zelllinien in zwei technische Replikate aufgeteilt: Replikat 1 entsprach dem jeweiligen unbehandelten parentalen Zelllinienäquivalent, Replikat 2 der jeweiligen Zelllinie wurde mit einer

kontinuierlich ansteigenden Dosis der Kombinationschemotherapie FOLFIRI, bestehend aus 5-Fluoruracil (5-FU), Irinotecan und Leucovorin (entspricht Folinsäure), zwei bis dreimal pro Woche über einen Zeitraum von ca. 14 Monaten behandelt (Abbildung 1, Tabelle 3), sodass die resistenten Zelllinien Colo205R, HT29R und SW480R etabliert werden konnten. Zur Behandlung wurden die o.g. Wirkstoffe in PBS verdünnt (5-FU: 0.5mg/ml, Irinotecan: 2mg/ml, Leucovorin: 1mg/ml). Das Behandlungsprotokoll wurde anhand Pozzi et al. (2016): „The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death“, erstellt und nach Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) (siehe 4.2) zelllinienspezifisch modifiziert.

FOLFIRI Konzentration (μM)										
-fache Menge	1	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	IC50 Colo205	IC50 HT29	IC50 SW480
5-FU	20	8	6	4	2	1	0.5	11.04	5.91	19.16
Irinotecan	60	24	18	12	6	3	1.5	33.12	17.72	57.48
Leucovorin	20	8	6	4	2	1	0.5	11.04	5.91	19.16

Tabelle 4: Verwendete FOLFIRI Behandlungskonzentrationen

Um die FOLFIRI-Resistenz zu wahren, wurde dem Medium zwei- bis dreimal wöchentlich die an die jeweilige Zelllinie angepasste FOLFIRI-Konzentration hinzugegeben. Die Zelllinien wurden als resistent definiert, wenn die IC50 Konzentration im Vergleich zum jeweiligen parentalen Äquivalent einen ≥ 2 Mal höheren Wert erreicht hatte.

4.2 IC50 Bestimmung

Um die Resistenz der resistenten Subzelllinien zu quantifizieren, wurde die IC50 bestimmt, bei welcher das Zellüberleben/-wachstum um die Hälfte reduziert wird. Am Tag 1 erfolgte das Ausplattieren von 2000 Zellen/Loch in Quadruplikaten in 96-Loch-Platten. Im Voraus wurden FOLFIRI Verdünnungsreihen nach in Tabelle 5 gezeigtem Schema hergestellt. Die Studie von Pozzi et al. (2016) diente als Grundlage sowohl für die unter 4.1 beschriebene Resistenzetablierung als auch für das Verhältnis der Behandlungskonzentrationen 5-FU: Irinotecan : Leucovorin von 1:3:1 für die IC50 Bestimmung.

x - fache FOLFIRI konzentration	5-FU- konzentration (μM)	Irinotecan- konzentration (μM)	Leucovorin- konzentration (μM)
20	400	1200	400
10	200	600	200
3	60	180	60
2.0	40	120	40
1.0	20	60	20
0.3	6	18	6
0.1	2	6	2
0.06	1.2	3.6	1.2
0.03	0.6	1.8	0.6
0.02	0.4	1.2	0.4
0.01	0.2	0.6	0.2
0.003	0.06	0.18	0.06
0.001	0.02	0.06	0.02
0.0003	0.006	0.018	0.006
0.0001	0.002	0.006	0.002
0	0	0	0

Tabelle 5: Verdünnungsreihe zur IC50-Bestimmung

Nach 24h wurden die Zellen mit den oben aufgeführten FOLFIRI Konzentrationen behandelt. Nach 72h Inkubationszeit wurde die Messung der Zellviabilität mittels Alamar Blau® (entspricht Resazurin) (Thermo Fisher Scientific™), einem Redoxindikator, durchgeführt: 10 μl Alamar Blau® wurden zu jedem Loch hinzugefügt und die Zellen wurden für weitere 4h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wird in lebenden Zellen Resazurin zu dem pinken und fluoreszierendem Resorufin reduziert (Rampersad, 2012). Die Messung der Absorption als Indikator für Zellviabilität erfolgte mit dem Varioskan Spektrometer (Thermo Fisher Scientific™). Fluoreszenzsignale wurden bei einer Anregungswellenlänge von 570nm, einer Anregungsbandweite von 12nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm gemessen (Rampersad, 2012). Die Berechnung und die graphische Darstellung der jeweiligen relativen IC50 Konzentration, die definiert ist als die Konzentration, die erforderlich ist, um die Kurve auf einen Punkt in der Mitte zwischen dem oberen und unteren Plateau zu bringen, erfolgte mit Excel und Prism GraphPad 5.

In Excel wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzsignale berechnet und in Relation zu den Fluoreszenzsignalen der unbehandelten Negativkontrolle gesetzt.

In Prism GraphPad 5 und 9 wurden im ersten Schritt die jeweiligen Behandlungskonzentrationen von 5-FU logarithmiert.

Nach folgender Gleichung erfolgte dann die Anpassung der Nicht-linearen Regression (Modell der variablen Neigung) und Berechnung der relativen IC50 Konzentration (*Relative vs. absolute IC50*, 2019):

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{(\log IC50 - X) * HillSlope})$$

Y: Viabilität in Prozent, X: Logarithmus der jeweiligen Behandlungskonzentration; Top/Bottom: Oberster/unterster Wert in Prozent, logIC50: Behandlungskonzentration, die eine Reaktion auf halbem Niveau zwischen Bottom und Top bewirkt, HillSlope: Neigungsfaktor

4.3 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Die Zelllinien wurden in Triplikaten in 6-Lochplatten ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Für die Gewinnung der RNA wurden die Zellen im ersten Schritt auf Eis zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Es wurden 350µl RLT Lysepuffer (QIAGEN®) hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Im Anschluss wurde die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN®) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration wurde nach Elution in 30µl RNase-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific™) mit dem Nanodrop 1000 Spektrometer (Thermo Fisher Scientific™) gemessen.

Für die Herstellung der komplementären DNA (cDNA) durch Reverse Transkription wurde das RevertAid Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific™) für ein Ansatzvolumen von 1µg RNA verwendet. Für die Reaktion wurde folgendes RT-PCR Reaktionsgemisch verwendet (Tabelle 6):

5x Reaction Buffer®	8µl
RiboLock RNase Inhibitor®	1µl
dNTP mix (10mM)	4µl
Random hexamer Primer	2µl
RevertAid® Reverse Transkriptase	2µl
RNA	1µg
RNase-freies Wasser	Auffüllen auf Gesamtvolumen von 40µl
Gesamtvolumen	40µl

Tabelle 6: Reaktionsgemisch für die Reverse Transkription (RT)

17µl des RT-Reaktionsgemischs, 1µg RNA und RNase-freies Wasser wurden vorsichtig in sterile, nuklease-freie PCR-Reaktionsgefäße gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde kurz zentrifugiert und im Anschluss nach folgendem Protokoll inkubiert (Tabelle 7):

Temperatur	Zeit
25°C	10min
42°C	60min
70°C	10min

Tabelle 7. Inkubationsprotokoll für Reverse Transkription

Für die Quantifizierung der Genexpression wurde das Universal ProbeLibrary System (UPL) mit LightCycler® 480 Probes Master Reagenzien (beides Roche Life Science®) und genspezifischen Primern (Biomers.net) (siehe 3.6) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Die PCR-Reaktion wurde in technischen Triplikaten wie in Tabelle 8 und Tabelle 9 gezeigt im CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories) vorbereitet und durchgeführt.

Reagenz	Volumen
Roche Probes Master®	5 µl
H ₂ O	2,8µl
Primer F 500nM	0,05µl
Primer R 500nM	0,05µl
UPL #	0,1µl
cDNA	2µl
Gesamtvolumen	10µl

Tabelle 8: Reaktionsmix für die RT-qPCR

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Präinkubation	95°C	10min	1
Amplifikation	95°C	10s	40
	60°C	15s	
Kühlen	40°C	30s	1

Tabelle 9: Reaktionsprotokoll RT-qPCR

Berechnung des Genexpressionslevels

Das *GAPDH*-Gen wurde als Kontroll- und Referenzgen für die Berechnungen verwendet.

Der Grad der Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode (Pfaffl, 2004) berechnet:

$$\Delta C_t = C_t (\text{interessierendes Gen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Resistentes Äquivalent}) - \Delta C_t (\text{Parentales Äquivalent})$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

4.4 Apoptose Assay und Zellzyklusanalyse

Nach 96h andauernder Behandlung mit der IC50 FOLFIRI Konzentration der jeweiligen parentalen Zelllinien (IC50_P, Tabelle 10), wurde ein Apoptose Assay mit Propidiumiodidfärbung (PI) und Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell scanning, FACS)) durchgeführt.

Apoptotische Zellen können an DNA-Verlust durch DNA-Fragmentierung aus permeabilisierten Zellen erkannt werden. Technisch erfolgt die Permeabilisierung mit 70%igem Ethanol. Die 182 Basenpaar (bp)-DNA-Fragmente treten aus der Zelle aus. Die Zellpopulation, die nun einen reduzierten DNA-Gehalt aufweist, wird im nächsten Schritt mit PI, einem Nukleinsäureinterkalator angefärbt (Warnes, 2019).

Während der Durchflusszytometrie wird PI mit grünem Laser-Licht angeregt und emittiert rotes Licht, das mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann (Riccardi & Nicoletti, 2006; Zbigniew & Xuan, 2004).

Es ergibt sich das typische DNA-Muster der Zellzyklusverteilung, das die Zellen in G1-, S- und G2M-Phase unterteilt (Abbildung 3).

Die G1-Phase ist charakterisiert durch Zellwachstum (Chromosomensatz 2n, 2C (Chromatide)). In der S-Phase erfolgt die Replikation (Chromosomensatz 2n, 4C). In der G2-Phase liegt der vollständig replizierte Chromosomensatz vor, worauf die mitotische Teilung (M-Phase) folgt.

Die Sub-G1 Phase, links des G0/G1-Peaks, repräsentiert die degradierte, fragmentierte DNA der apoptotischen Zellen (Darzynkiewicz et al., 2001; Jayat & Ratinaud, 1993; Riccardi & Nicoletti, 2006; Warnes, 2019; Zbigniew & Xuan, 2004).

Die jeweiligen Zelllinienpaare wurden in jeweils drei separate T25-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50-70% kultiviert. Je eine Zellkulturflasche blieb als Negativ-Kontrolle (NK) unbehandelt, eine wurde als Positivkontrolle (PK) für 24h mit 1µM Staurosporin (ImmunoChemistry Technologies) kultiviert und die Dritte wurde für 96h mit FOLFIRI IC50_P behandelt.

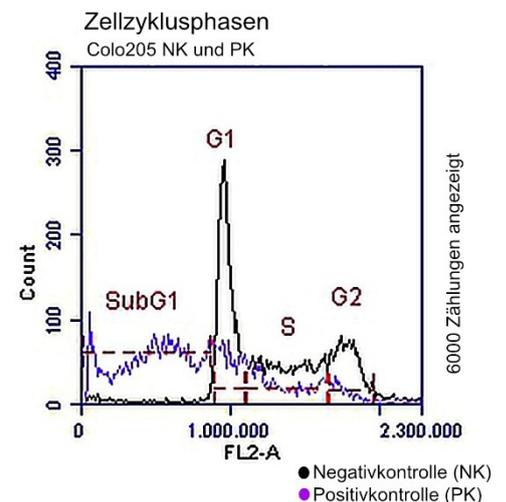


Abbildung 3: Normale Zellzyklusphasen am Beispiel der Colo205 P Positiv- und Negativkontrolle

Schwarz: Negativkontrolle, Colo205P unbehandelt, Lila: Positivkontrolle; Colo205P behandelt mit 1µM Staurosporin über 24h

Zelllinie	5-FU (μl)	Leucovorin (μl)	Irinotecan (μl)	Medium (ml)
Colo205	0.83	1.51	2.80	5.99
SW480	3.07	5.58	10.38	5.98
HT29	2.71	4.92	9.15	5.98

Tabelle 10: IC50_P FOLFIRI-Volumina des Apoptose Assays

Das Medium mit den abgelösten Zellen und Zelltrümmern wurde abgesaugt und die noch adhären Zellen mit 1ml Trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) (PAN-Biotech™) gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurde das Zellsediment mit 5ml PBS resuspendiert, nochmals für 4min bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgte die Fixation mit 70%igem Ethanol für >2h oder über Nacht bei 4°C.

Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 400 μl PI/TritonX100/RNaseA Lösung (Tabelle 11) für 30min bei 37°C inkubiert.

Reagenzien	Volumen
PBS	17,7ml
Triton X-100 20%	100 μl
RNase A	1000 μl
PI (1,0mg/ml)	1200 μl
Gesamtvolumen	20ml

Tabelle 11: Propidiumiodidfärbelösung für die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem BD Accuri 6 Durchflusszytometer (Becton & Dickinson) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt: Es wurden pro Zelllinie und Behandlung 10.000 Zellen bei einer mittleren Flussrate gemessen. Die Datenaufbereitung und Analyse erfolgte mit der DB Accuri C6 Analyse Software.

Zur Bestimmung der potentiellen Apoptose-Resistenz in den FOLFIRI-resistenten Zellen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der Sub-G1 Phase folgendermaßen bestimmt:

Als signifikant bewertet wurden Veränderungen der Ratio:

$$\frac{\text{Anzahl parentale Zelllinie in Phase SubG1, G1, S, G2}}{\text{Gesamtanzahl parentale Zelllinie}} \div \frac{\text{Anzahl resistente Zelllinie in Phase SubG1, G1, S, G2}}{\text{Gesamtanzahl resistente Zelllinie}}$$

der entsprechenden Zellzyklusphase von >3 bzw. < 0,5 (Tabelle 14).

Beispielrechnung für Colo205:

$$\text{Ratio SubG1} = \frac{\text{Anzahl Colo205P in SubG1/Gesamtanzahl Colo205P}}{\text{Anzahl Colo205R in SubG1/Gesamtanzahl Colo205R}} = \frac{3003/9514}{1238/17625} = 4,49$$

4.5 Next generation sequencing (NGS)

Mittels NGS wurde überprüft, ob es im Rahmen der Resistenzentwicklung zu Mutationen auf DNA-Ebene gekommen ist. Die genomische DNA wurde mittels des Qiagen DNA mini Kits (QIAGEN®) nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die Sequenzierung wurde von der Molekularpathologie des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. 20ng DNA wurden zur Library-Generierung mittels Oncomine Comprehensive v3 Assay verwendet. Dieser Assay untersucht Punktmutationen, kleinere Insertionen/Deletionen in 161 sowie Genamplifikationen in 43 Tumor-assoziierten Genen ab. Die Libraries wurden auf 540er Chips auf einem Ion GeneStudio™ S5 Prime System sequenziert (jeweils Thermo Fisher Scientific™). Die Analyse und Variantenbeurteilung der Sequenzierdaten wurden mittels TorrentSuite™ Version 5.8 und der IonReporter Software Version 5.10 (IonTorrent™, Thermo Fisher Scientific™) über eine hausinterne Excel/Python Pipeline durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Variantenbeurteilung die Clinvar- (Landrum et al., 2018) und COSMIC (Tate et al., 2019) -Datenbanken sowie VarSome (Kopanovs et al., 2019) verwendet.

4.6 RNA-Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung wurde mit insgesamt 24 Proben, zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten pro Zelllinie, durchgeführt.

Für die Gewinnung der RNA wurden die Zellen nach regelmäßiger Behandlung mit FOLFIRI (Tabelle 4) in 6-Lochplatten, 200.000 Zellen/Loch, ausplattiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~ 70% erfolgte die RNA-Isolation (siehe 4.3). Die RNA wurde mit RNase freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific™) für die Sequenzierung auf 5ng/µl verdünnt und bei -4°C gelagert.

Die Sequenzierung der Poly(A)-RNA wurde mit einer modifizierten Version des zuvor beschriebenen Protokolls durchgeführt, das auch die Sequenzen der verwendeten Primer enthält (Soumillon et al., 2014). Kurz zusammengefasst, wurde eine Reverse Transkription von 25ng fragmentierter Gesamt-RNA mit der Maxima H Minus Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific™) unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die Barcode- und Unique Molecular Identifier (UMI)-Sequenzen (E3V6NEXT-Primer) sowie den universellen

Adapterprimer (E5V6NEXT) enthalten, durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde mit dem DNA-Clean & Concentrator-5-Säulen (Zymo Research GmbH) gereinigt, mit Exonuklease I (New England Biolabs Inc.) behandelt und im Anschluss unter Verwendung der KAPA Hifi Hot Start Polymerase (Roche Life Science®) und des SINGV6-Primers amplifiziert (12 PCR-Zyklen). Die PCR-Produkte wurden mit AMPure-Beads (Beckman Coulter Diagnostics) gereinigt und die gereinigte DNA wurde mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific™) quantifiziert.

Anschließend wurde das Nextera XT DNA-Library-Vorbereitungskit (Illumina®) für die schnelle Library-Vorbereitung gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet, mit der Abweichung, dass der i5-Primer durch den P5NEXTPT5-Primer ersetzt wurde. Die Qualität der Bibliothek wurde durch Qubit Quantifizierung (Thermo Fisher Scientific™) und mit einem Aligent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung von Agilent High-Sensitivity DNA-Chips (Agilent Technologies, Inc.) überprüft.

Die Sequenzierung der RNA-Library erfolgte im Gen Center München, Arbeitsgruppe Dr. H. Blum, auf einer Illumina HiSeq1500.

Die Qualität der RNA-Sequenzierung (siehe 5.3.1) wurde auf dem EU-Galaxyserver (<https://usegalaxy.eu/>; Nekrutenko et al. (2020)) mit den Tools „FastQC“ und „MultiQC“ verifiziert (Andrews, n.d.; Ewels et al., 2016).

4.7 Bioinformatische Datenanalyse und Statistik

4.7.1 Auswertung und statistische Analyse der Zellkulturexperimente

Die Aufbereitung der Ergebnisse in Graphen sowie die statistische Signifikanz der jeweiligen Gruppenunterschiede wurde mithilfe des Student's t-test unter Verwendung von GraphPadPrism 5 und 9 sowie Microsoft Office Excel ermittelt.

4.7.2 Analyse der RNA-Sequenzierung

Die ersten Verarbeitungsschritte der Sequenzierrohdaten wurden auf dem LAFUGA-Galaxy-Server (Labor für funktionelle Genomanalyse (LAFUGA) des Genzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München) von Frau Dr. Julia Philippou-Massier durchgeführt. Zu diesen gehörten: Dekompression der Daten (Tool: „Convert compressed file to uncompressed“, (Galaxy Version 1.0.0)), Verkettung von Barcode und Sequenz (Tool: „Concatenate datasets tail-to-head“ (Gruening, 2014), Galaxy Version 1.0.0), Zuordnen der RNA Sequenzen zu den Proben (Tool „Je-Demultiplex demultiplexes fastq files“ (Girardot et al., 2016), Galaxy Version 1.2.1), Mappen auf das Referenzgenom hg38 (Genome

Reference Consortium Human Build 38) (Tool: „RNA STAR Gapped-read mapper for RNA-seq data“ (Dobin et al., 2012), Galaxy Version 2.5.2b-0) und Berechnung der Anzahl der Reads pro Gen (Tool: „HTSeq-count (Anders et al., 2014), Galaxy Version 1.0.0).

Auf dem EU- Galaxy Server (Nekrutenko et al., 2020) wurden die erhaltenen rohen Zählraten mit den Bioconductor-Softwarepaketen Limma und edgeR statistisch analysiert (Law et al., 2014; Liu et al., 2015; Ritchie et al., 2015; Robinson et al., 2010; Smyth, 2005). Folgende Einstellungen wurden verwendet (siehe auch 5.3.3): Filtern der niedrig exprimierten Gene anhand Mindest-CPM (Counts per Million) von 10 in mindestens zwei Proben (Law et al., 2016), TMM-Normalisierung (Trimmed mean of M-values) (Mark D. Robinson & Alicia Oshlack, 2010), statistische Gewichtung der Probenvarianz (Liu et al., 2015), Anwendung der TREAT-Methode (t-tests relative to a threshold) (McCarthy & Smyth, 2009) und die robuste Hyperparameter-Schätzung (Phipson et al., 2016).

Als statistisch signifikanter Unterschied wurde ein zweiseitiger Alpha-Fehler von 5% ($p < 0.05$) und eine log₂-fold change $|\geq 1|$ definiert. Hinsichtlich der p -Werte handelte es sich sowohl um Standard- p -Werte als auch um p -Werte, die an die hohe Anzahl gleichzeitiger Tests angepasst wurden (p -adjusted). Als p -Wert Anpassungsmethode für multiples Testen wurde die Methode von Benjamini und Hochberg (BH) zur Kontrolle der Falschentdeckungsrate in Höhe von 5% für alle Gene verwendet (Benjamini & Hochberg, 1995). Dies diente zur Reduktion der Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse.

4.8 Analyse der Genontologie

Die GeneOntology (GO)-Analyse wurde mit PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship) V.17.0 in Kombination mit der humanen Gendatenbank (Safran et al., 2021) durchgeführt (Ashburner et al., 2000; Safran et al., 2021; Thomas et al., 2003).

Die statistischen Algorithmen von PANTHER sind mit den Algorithmen anderer Tools, wie DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Sherman et al., 2007) oder GSEA (Gene set enrichment analysis) vergleichbar (Mi et al., 2013; A. Subramanian et al., 2005).

Die GSEA-Software (V. 4.1.0) wurde eingesetzt, um die differentiell exprimierten Gene der einzelnen Zelllinien auf gemeinsame Resistenzmechanismen zu untersuchen. Die Genset-Sammlung „Hallmark“ wurde aus der molekularen Gensignatur-Datenbank (MSigDB) V 7.5 entnommen. Eine Falschentdeckungsrate von $\leq 25\%$ wurde als signifikant angereichert betrachtet (*Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) User Guide*).

4.9 Klinische und transkriptomische Daten

Für den Vergleich mit klinischen Expressionsdaten wurde der von Del Rio et al. (2007) veröffentlichte klinische und transkriptomische Datensatz verwendet. Dieser wurde von der Gene Expression Omnibus-Datenbank (GEO) bezogen (Clough & Barrett, 2016), GEO Zugangsnummer GSE62322.

Die Auswahl der Patienten und die FOLFIRI-Chemotherapieprotokolle der klinischen Studie wurden an anderer Stelle beschrieben (Del Rio et al., 2007).

Die Genexpressionsdaten der Patientenproben wurden unter Verwendung des Human Genome GeneChip® Arrays U133 generiert.

Aus dem Datensatz wurden die Gen-Expressionsdaten der Primärtumorproben (FOLFIRI-Ansprecher und FOLFIRI Nicht-Ansprecher) für die differentiell exprimierte Gene der einzelnen Zelllinien extrahiert (Colo205: 222 Gene, HT29: 47 Gene, SW480: 30 Gene). Diese Expressionsdaten wurden mit oben aufgeführten Arbeitsprozess und Signifikanzkriterien mit den Softwarepaketen „limma“ (Law et al., 2014; Liu et al., 2015; McCarthy & Smyth, 2009; Ritchie et al., 2015) und „edgeR“ (Robinson et al., 2010) auf der Galaxy.eu Plattform analysiert.

4.10 Überlebenszeitanalyse

Die Überlebenszeitanalysen (Expressionsdaten des Kolon Adenokarzinom (colon adenocarcinoma, COAD), bezogen aus dem cBioPortal ((Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013); www.cbioportal.org, abgerufen am 01. Mai 2022): Projekt: TCGA COAD, Projekt-ID: TCGA-AA-3715) unter Verwendung der Kaplan-Meier Methode wurden mit R und RStudio (R Version 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing) erstellt. Es wurden die R-Pakete „dplyr“, „ggfortify“, „ggplot2“, „ggpubr“, „ranger“, „survminer“ und „survival“ verwendet. Das Gesamtüberleben (OS) wurde mit der Kaplan-Meier-Methode ermittelt und mit dem Logrank-Test unter Verwendung der R-Pakete ggplot2 und survival verglichen. Der Effekt der molekularen Marker wurde mit dem Cox-Proportional-Hazards-Modell (survminer R-Paket) berechnet, um den optimalen Grenzwert für die Abgrenzung zwischen hoher und niedriger Expression zu ermitteln. Der Cut-off-Wert für die Genexpression, der zwischen hoher und niedriger Expression unterscheidet, wurde anhand der maximalen Rangstatistik (Hothorn & Lausen, 2002) ermittelt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von <0.05 (zweiseitig) bewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung FOLFIRI-resistenter Zelllinien-Äquivalente

Für die Herstellung gegen die Kombinationschemotherapie, bestehend aus 5-Fluoruracil (5-FU), Irinotecan und Leucovorin (FOLFIRI), resistenter Sublinien wurden die Kolorektalkarzinom (KRK) -Zelllinien Colo205, HT29 und SW480 mit aufsteigenden FOLFIRI-Konzentrationen behandelt. Das Behandlungsprotokoll wurde anhand Pozzi et al. (2016) erstellt. Das dort etablierte FOLFIRI-Konzentrationsverhältnis diente als Grundlage, da in dem verwendeten Versuchsansatz das Zellwachstum der verwendeten hEGFR-CT26 Zellen (CT29 KRK Mauszelllinie, welche den humanen EGFR Rezeptor exprimiert) am stärksten vermindert wurde, aber nicht zum Erliegen kam (siehe Anhang Supplementäre Abbildung 1, entnommen aus Supplementäre Abbildung 2d in Pozzi et al. (2016)). Definiert als 1x FOLFIRI wurde demnach: 20µM 5-FU, 60µM Irinotecan, 20µM Leucovorin. Die Startkonzentration betrug das 0.05-fache der o.g. Konzentration. Dies wurde innerhalb von drei Monaten auf das 0.1 bis 0.4-fache gesteigert. Um den Verlauf der Resistenzentwicklung zu überprüfen, wurde nach einer Behandlungszeit von drei Monaten im Abstand von 4 bis 6 Wochen mittels Resazurin Assay (syn. Alamar Blau®) die Konzentration bestimmt, bei der die Zellviabilität um die Hälfte reduziert ist (IC₅₀). Anhand dieser Ergebnisse wurden die FOLFIRI-Behandlungskonzentrationen im o.g. Verhältnis (1:3:1) an die jeweilige Zelllinie angepasst und um weitere 4-5 Monate gesteigert (Abbildung 4 a). Schließlich wurden die resultierenden Zelllinien, deren IC₅₀ Konzentration ≥ 2 -mal höher war als die der jeweiligen parentalen Ausgangszelllinie, als FOLFIRI-resistente Sublinien Colo205R, HT29R und SW480R bezeichnet (Abbildung 4 b-c).

Wie in Tabelle 12 und Abbildung 4 gezeigt, konnte in Colo205R (IC₅₀ 11.04 µM für 5-FU) und SW480R (19.16 µM) eine deutlich höhere Resistenz im Vergleich zum parentalen Äquivalent (0.53 µM in Colo205P, 1.97µM in SW480P) erreicht werden. Der Resistenzindex betrug bei Colo205 ~ 20.8 und ~ 9.8 bei SW480. In HT29R Zellen wurde eine ~ 2.5 -fach höhere IC₅₀ Konzentration für 5-FU etabliert (5.91 µM in HT29R vs. 2.32 µM in HT29P). Dadurch konnte die FOLFIRI-Resistenz in den drei KRK Zelllinien bestimmt werden, die in Folge-Experimenten weiter charakterisiert werden sollten.

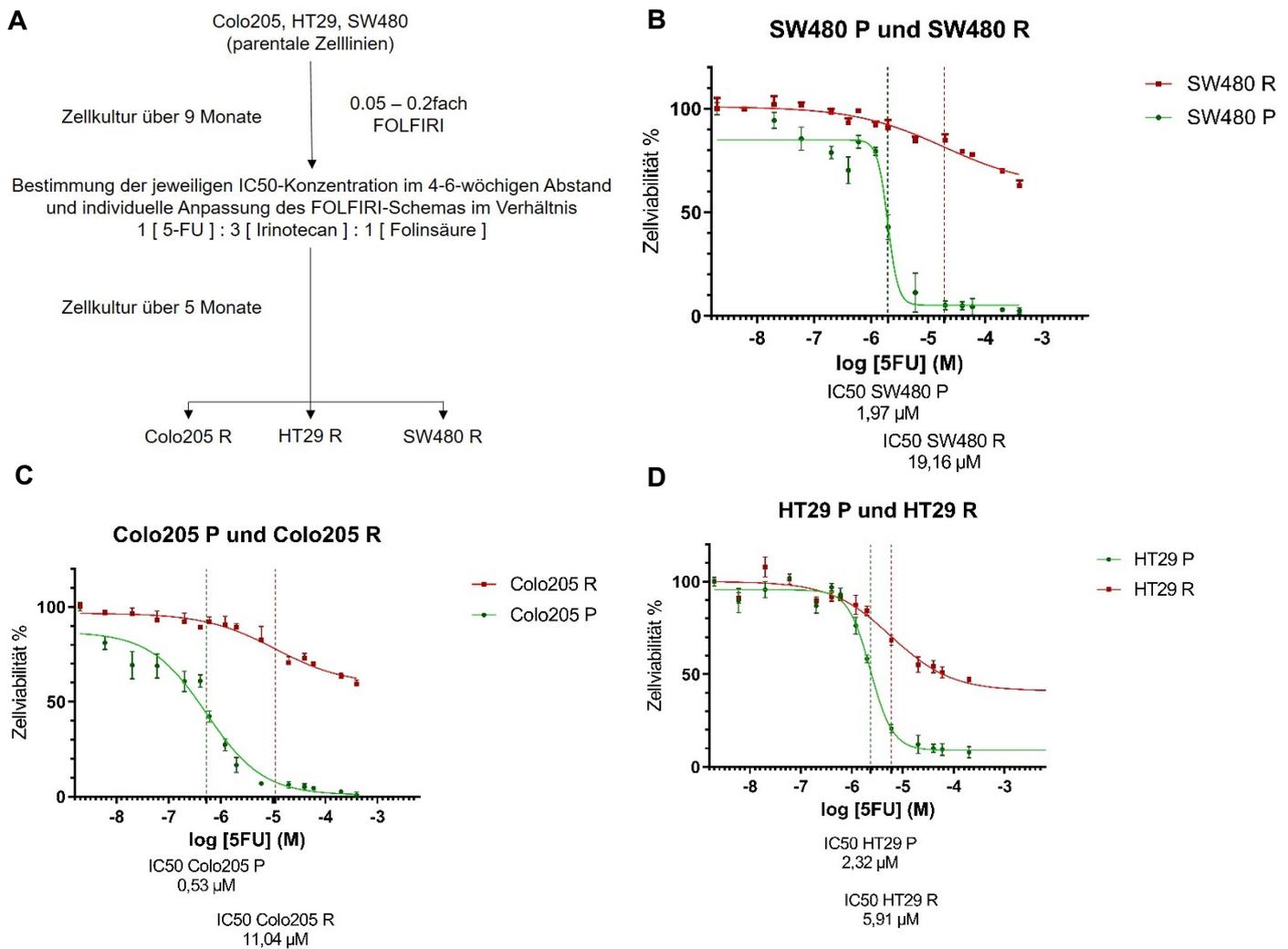


Abbildung 4: Etablierung FOLFIRI-resistenter Zelllinien: IC50 Konzentration vor RNA-Sequenzierung (a) Vorgehen für die Etablierung resistenter Zelllinien (b)-(d) Die Zellviabilität von Colo205P, Colo205R, HT29P, HT29R, SW480P und SW480R wurde nach 72h FOLFIRI-Behandlung getestet. Die Ergebnisse zeigen den Durchschnittswert mit Standardabweichung von Triplikaten.

Zelllinie	Finale IC50 Konzentration vor RNA-Sequenzierung			
	5-FU [µmol/l]	Irinotecan [µmol/l]	Leucovorin [µmol/l]	RI
Colo205P	0.53	1.59	0.53	20.81
Colo205R	11.04	33.12	11.04	
SW480P	1.97	5.90	1.97	9.75
SW480R	19.16	57.48	19.16	
HT29P	2.32	6.96	2.32	2.55
HT29R	5.91	17.72	5.91	

Tabelle 12: IC50 Konzentrationen von Colo205, HT29, SW480 und ihrer resistenten Subzelllinien. RI= Resistenzindex (IC50 parental/IC50 resistent)

5.2 Charakterisierung der Zelllinien und Nachweis biologischer Effekte

5.2.1 Auswirkung der erworbenen FOLFIRI-Resistenz auf die Apoptoseinduktion

Zu Tumorentwicklung und –wachstum trägt Resistenz gegenüber Apoptose bei (Hanahan & Weinberg, 2011). Blondy et al. (2020) beschreiben in ihrem Review, welche molekularen Mechanismen dazu beitragen, dass KRK Zellen dazu in der Lage sind, zelluläre Programme wie die Apoptose, Autophagie und den Zellzyklus so zu modulieren, dass sie in der Lage sind, dem 5-FU-induzierten Zelltod zu entgehen.

Um Unterschiede der Zellzyklus-Verteilung (G0/G1, S und G2-Phase) zwischen den parentalen und resistenten KRK-Zelllinien zu detektieren sowie um die Auswirkung der Resistenzentwicklung auf die Apoptoserate bzw. eine mögliche Apoptoseresistenz (SubG1-Phase) der jeweiligen resistenten Zelllinien nachzuweisen, wurde ein Apoptose Assay nach einer 96h andauernden FOLFIRI-Behandlung mit anschließender Propidiumiodidfärbung (PI) und Durchflusszytometrie durchgeführt (Riccardi & Nicoletti, 2006; Zbigniew & Xuan, 2004). Die Zelllinien wurden mit der IC50 Konzentration der jeweiligen parentalen Zelllinie behandelt (Tabelle 13).

IC50 Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$]	5-FU [μM]	Leucovorin [μM]	Irinotecan [μM]
Colo205P	0.53	0.53	1.59
SW480P	1.97	1.97	5.90
HT29P	1.73	1.73	5.20

Tabelle 13: IC50 Konzentrationen der jeweiligen parentalen Zelllinien

Die Positivkontrolle erfolgte mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin, einem potenten Apoptoseinduktor (Belmokhtar et al., 2001). Staurosporin induzierte in Colo205P, Colo205R, HT29P und HT29R Apoptose, ersichtlich an der erhöhten SubG1-Fraktion (Abbildung 5a, b). Wie Malsy et al. (2019) bereits beobachtet hatten, zeigten SW480 Zellen keine zeitabhängigen Veränderungen der Zellzyklus-Fraktionen (Abbildung 5c).

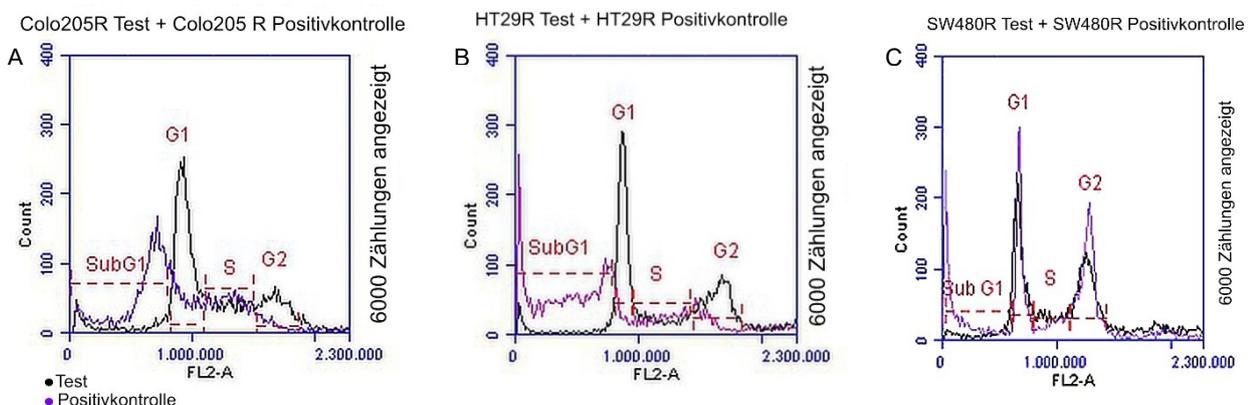


Abbildung 5: Positivkontrolle der Durchflusszytometrie nach 24h Inkubation mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin

Schwarze Kurve: 96h-FOLFIRI behandelte Probe der jeweilig resistenten Zelllinie, Lila Kurve: 24h-

Staurosporin behandelte Probe der jeweils resistenten Zelllinie (a) Colo205R (b) HT29R (c) SW480R

Um ein Überwuchern mit weniger resistenten Klonen zu verhindern, wurden die jeweilig resistenten Zelllinien in FOLFIRI-haltigem Medium kultiviert. Hierdurch zeigte sich ihre Verdopplungszeit im Vergleich zu den parentalen Äquivalenten stark verlängert, was die Akquirierung einer ausreichenden Zellzahl für biologische Replikate für die FACS-Analyse deutlich zu aufwendig machte.

Aus diesem Grund wurde das Experiment in einfacher Ausführung durchgeführt.

Dementsprechend sind die Veränderungen der Ratio als orientierender Trend zu werten.

Unbehandelte Zellen (Negativkontrolle, NK) zeigten das typische DNA Muster, welches die Phasen SubG1, G1, S und G2/M des Zellzyklus repräsentiert.

In der Zelllinie Colo205P zeigten sich im Vergleich zu Colo205R nach 96h Behandlung ~4.5-fach mehr Zellen in der SubG1-Phase. Diese ist durch degradierte DNA von fragmentierten und apoptotischen Zellen charakterisiert (Tabelle 14, Abbildung 6, 7).

Die FOLFIRI-Behandlung verursachte in Colo205P eine begleitende Verminderung der G1-Population (~ 8.81%) verglichen mit der Negativkontrolle (~ 33.33%), wohingegen sich der Prozentsatz der Zellen in der S- und G2 Phase nicht stark verändert hat (Abbildung 8. Abbildung 8, Tabelle 15). Dies lässt darauf schließen, dass FOLFIRI auf parentale Colo205 Zellen einen zytotoxischen Effekt hat.

	SubG1-Verhältnis	G1- Verhältnis	S- Verhältnis	G2- Verhältnis
Colo205P/Colo205R	4.49	0.23	1.23	0.97
HT29P/HT29R	0.97	1.20	0.99	0.80
SW480P/SW480R	1.11	0.28	0.85	1.51

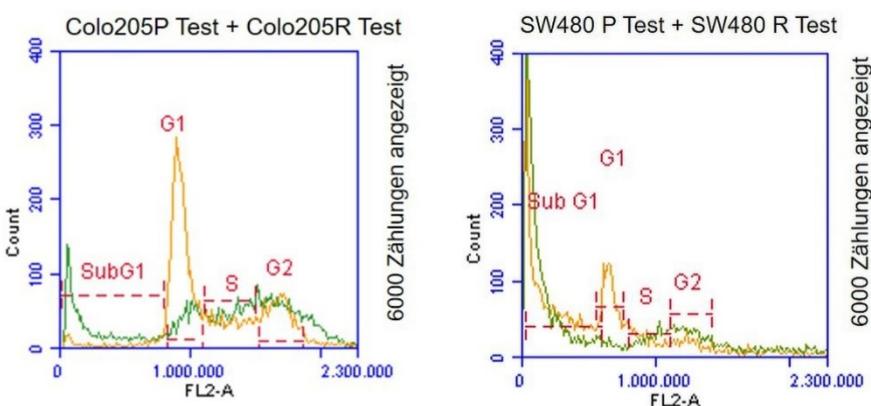


Tabelle 14: Veränderungen der Zellzyklusverteilung nach FOLFIRI Behandlung

● Parental Test
● Resistent Test

Abbildung 6: Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 96h FOLFIRI-Behandlung

Zellzyklusanalyse für (a) Colo205: Zytotoxische Wirkung von FOLFIRI auf Colo205P. Zellzyklusanalyse für (b) SW480: Transitorischer Arrest SW480R in der G1 Phase.

Hinsichtlich der resistenten Zelllinie Colo205R zeigten sich nach Behandlung keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung bei Vergleich mit der Negativkontrolle (Abbildung 9, Abbildung 9). Dies bestätigt die zuvor nachgewiesene Resistenz gegenüber FOLFIRI und deutet darauf hin, dass diese Zellen mithilfe von Zellzyklus-regulierenden Genen einen Mechanismus initiieren, um den FOLFIRI-induzierten Zelltod zu umgehen.

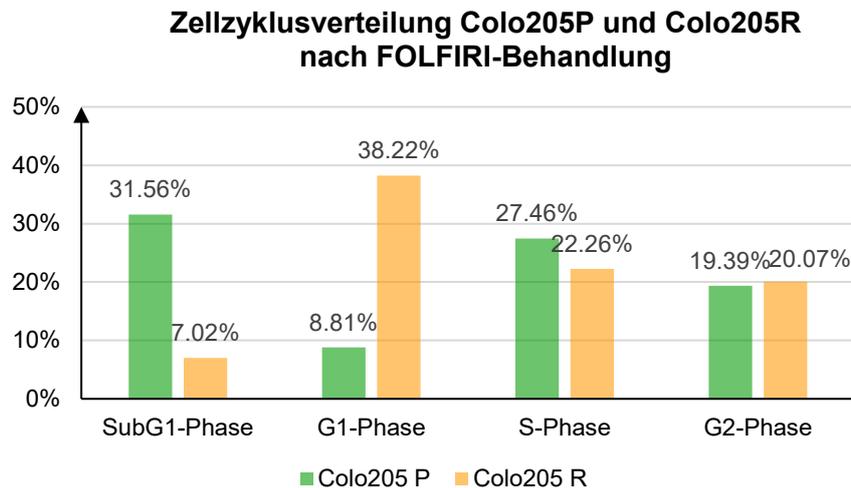


Abbildung 7: Zellzyklusverteilung Colo205P und Colo205R
Colo205P (grün) und Colo205R (orange) nach FOLFIRI-Behandlung

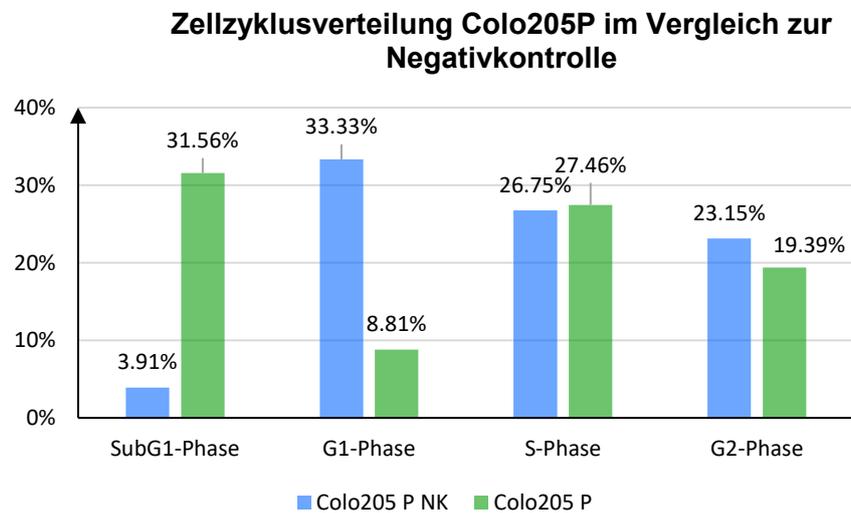


Abbildung 8: Zellzyklusverteilung Colo205P
Colo205 Negativkontrolle (blau) und Colo205P IC50-FOLFIRI behandelt (grün)

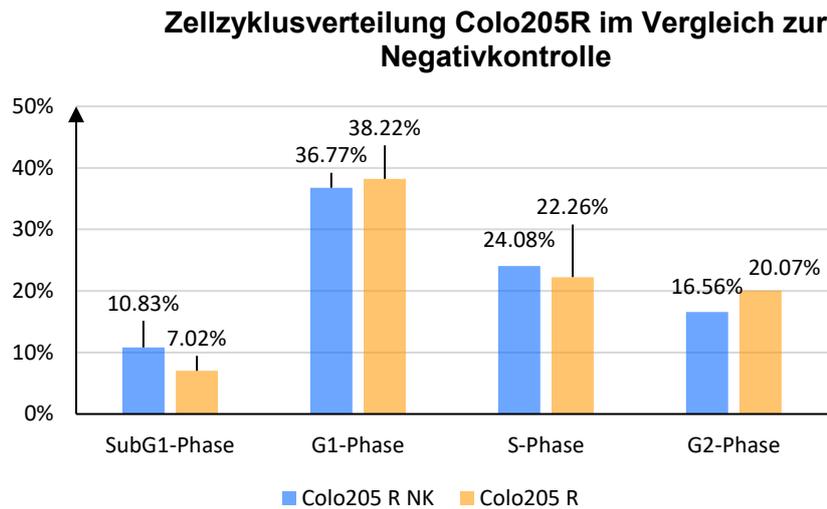


Abbildung 9: Zellzyklusverteilung Colo205R

Colo205R Negativkontrolle (blau) und Colo205R IC50-FOLFIRI behandelt (orange)

Die Zellzyklusverteilung von FOLFIRI-behandelten SW480R Zellen zeigte nach 96h Behandlung einen transienten Arrest der resistenten Zellen in der G1 Phase (17.48% vs. 4.83% in SW480P). Darüber hinaus bestand weder ein großer Unterschied zwischen SW480P und SW480R in der Sub-G1 Population noch in der übrigen Zellzyklusverteilung (Tabelle 15).

Zelllinie	SubG1-Phase	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
Colo205P	31.56%	8.81%	27.46%	19.39%
Colo205R	7.02%	38.22%	22.26%	20.07%
SW480P	62.39%	4.83%	9.61%	10.70%
SW480R	56.19%	17.48%	11.25%	7.08%
HT29P	33.35%	15.89%	38.32%	7.06%
HT29R	34.48%	13.29%	38.89%	8.80%

Tabelle 15: Durchflusszytometrie nach 96h FOLFIRI-Behandlung

Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil der Zellen der jeweiligen Zellzyklusphase.

Eine Übersicht der Zellzyklusanalyse zeigt Tabelle 15.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Resistenzentwicklung in Colo205 am stärksten ausgeprägt ist. Da die Resistenz der Zelllinien im Vorhinein mittels IC50 Bestimmung bestätigt worden ist, kommen als Ursache für die hohe Sub-G1 Population der resistenten HT29 und SW480 einerseits die im Vergleich geringere Resistenzentwicklung in Frage, andererseits kann auch das fehlende frische Medium mit FBS nach 48h eine erhebliche Rolle bei der erhöhten Zelltodrate spielen.

5.2.2 Veränderungen von Genexpression und Morphologie bei Resistenzentwicklung

Um die Genexpression in parentalen Zellen und ihren resistenten Äquivalenten zu vergleichen sowie zur Validierung einer vergleichbaren Genexpression in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen, wurde eine quantitative-Echtzeit-PCR (qRT-PCR) für die Gene von E-Cadherin (*ECAD*), Vimentin (*VIM*) und der Thymidylatsynthase (*TYMS*) durchgeführt. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) verwendet.

Die Thymidylatsynthase (*TYMS*) ist ein wichtiger Angriffspunkt für 5-FU. Vorangegangene Studien haben in 5-FU resistenten Zelllinien eine signifikante Amplifikation des *TYMS*-Gens und eine Überexpression des *TYMS*-Proteins nachgewiesen (Copur et al., 1995; Shibata et al., 1998).

E-Cadherin und Vimentin spielen bei der EMT (Epithelial-mesenchymale-Transition) von KRK-Zellen eine wichtige Rolle. Diese ist mit Tumorprogression, -invasion, Metastasierung und auch Chemotherapieresistenz assoziiert (Dudas et al., 2020). Bei der EMT werden Gene, die für die Ausbildung eines epithelialen Phänotyps verantwortlich sind, wie *ECAD* (E-Cadherin), herunterreguliert und stattdessen die Expression für jene Genprodukte aktiviert, die die Zelle einen mesenchymalen Phänotyp annehmen lassen, wie unter anderem *VIM* (Vimentin) (Vu & Datta, 2017).

Vor diesem Hintergrund wurden *ECAD*, *VIM* und *TYMS* als Vergleichsgene zwischen parentalen und resistenten Zelllinien ausgewählt.

Bei allen resistenten Subzelllinien zeigte sich eine signifikante, ~ 2 bis 4-fach erhöhte *VIM*-Expression (Abbildung 12 b, e, h). Weiterhin fand sich in Colo205R eine verminderte *ECAD*-Expression (Abbildung 12 d). Dazu passend änderte sich im mikroskopischen Vergleich die Morphologie der Zellen (Abbildung 10): Colo205 Zellen haben eine kugelförmige Gestalt, sind gleichgroß und wachsen adhärent. Die resistenten Zellen zeigten eine veränderte Morphologie hin zu einem mesenchymalen Phänotyp mit länglicher Form, was zu der erhöhten *VIM*-Expression passt (Abbildung 10 b, weiße Pfeile).

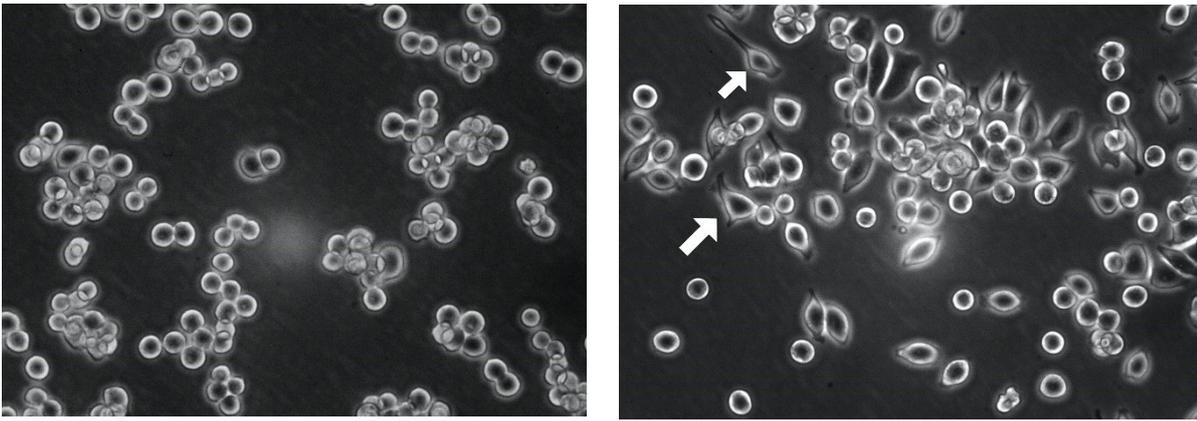


Abbildung 10: Colo205: Vergleich der Zellmorphologie

(a) Colo205P und (b) Colo205R: Weißer Pfeil: Mesenchymaler Phänotyp; 40-fach vergrößert

Es ist bekannt, dass die Zelllinie SW480 aus zwei Subpopulationen gebildet wird, bestehend aus dem epithelialen Typ (E-Typ), welcher normalerweise ca. 98% der Population ausmacht und dem runden Typ (R-Typ). Tomita et al. (1992) beschreiben den epithelialen Typ als flache und polygonale Epithelzellkolonien.

R-Typ Zellen sind rund, wachsen in gestapelten Clustern, wenig adhäsiv an Kulturplatten. Wie Abbildung 11 zeigt, entsprechen parentale SW480 (SW480P) dem E- dominanten Typ, während SW480R Zellen weitestgehend dem R-Typ entsprechen.

Dazu passend wiesen SW480R Zellen ein Wachstum in mitunter gestapelten Zellclustern auf, welche sich von der Kulturplatte ablösten (Abbildung 11 b, roter Pfeil). Gleichzeitig waren die *ECAD*-Level im Vergleich signifikant erhöht (29-fach; Abbildung 12 a), welches mit den sehr dichten Zellclustern korreliert.

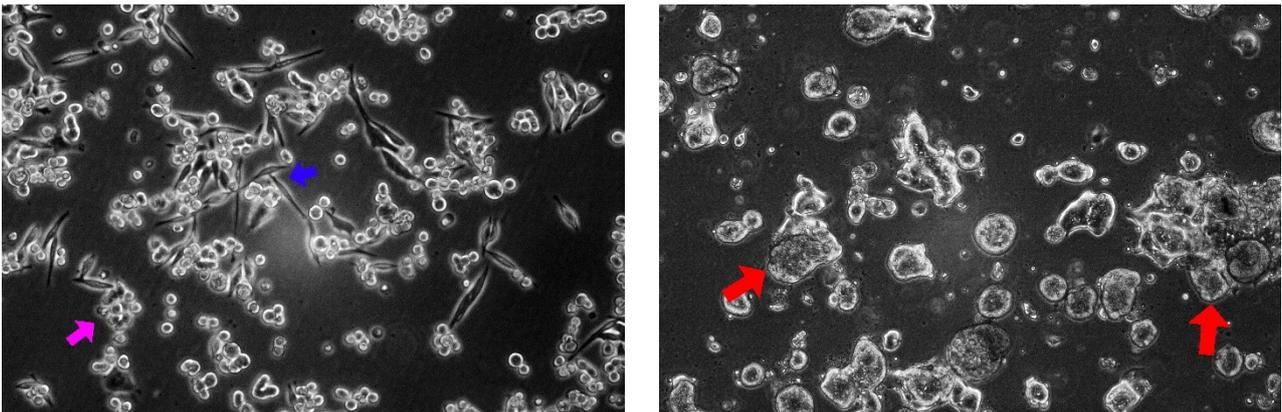


Abbildung 11: SW480: Vergleich der Zellmorphologie

(a) SW480P: Gemischt elongierter (blauer Pfeil) und runder, flacher Phänotyp (rosa Pfeil) (b) SW480R: Runder Phänotyp, Wachstum in Clustern (roter Pfeil rechts) und Ablösung von der Kulturplatte (roter Pfeil links); 20-fache Vergrößerung

Hinsichtlich der Morphologie zeigten HT29 Zellen keine Veränderung. Es konnte im resistenten Äquivalent auch keine Veränderung der *ECAD*-Expression festgestellt werden.

Eine Erhöhung des *TYMS*-mRNA- Level konnte sowohl in HT29 (~1.5-fach) als auch in Colo205R (~3.9-fach) festgestellt werden ($p < 0.001$), wohingegen in SW480R Zellen eine verminderte *TYMS*-Expression nachgewiesen wurde (Abbildung 12 c, f, i).

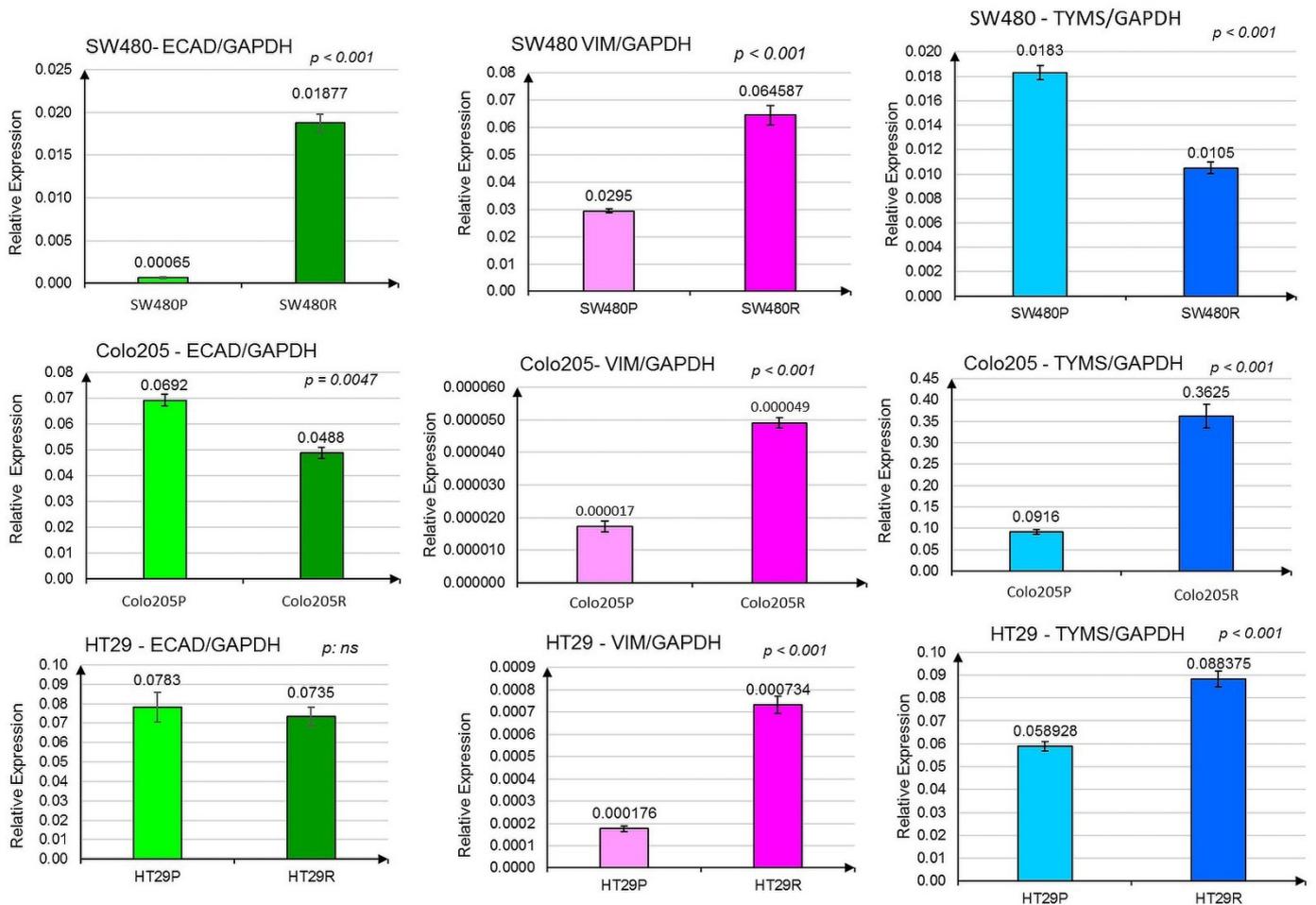


Abbildung 12: qRT-PCR für die Gene *ECAD*, *VIM* und *TYMS*

(a)-(c) SW480, (d)-(f) Colo205 und (g)-(i) HT29; Gezeigt ist ein repräsentatives Balkendiagramm pro Zelllinie und Gen. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Von jeder Zelllinie wurden pro Experiment sechs technische Replikate erstellt, wobei drei Ausführungen der qPCR pro technischem Replikat erfolgten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Messwerten an. Der p -Wert ist das Ergebnis des ungepaarten t-Tests.

Zusammenfassend sieht man an der Genexpression, gezeigt in Abbildung 12, dass sich die Zelllinien Colo205 und HT29 hinsichtlich der Veränderung der Genexpression gleichen: Bei beiden Zelllinien zeigte sich die Herunterregulation von *ECAD* und die Hochregulation von *VIM* und *TYMS*, während *TYMS* und *ECAD* bei der Resistenzentwicklung von SW480 gegensätzlich reguliert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass Colo205 und HT29 besser miteinander vergleichbar sind.

5.2.3 Vergleich des Mutationsstatus der Zelllinien und Überprüfung auf relevante DNA Mutationen

Um den Mutationsstatus der kolorektalen Zelllinien Colo205, HT29 und SW480 zu vergleichen sowie, um im Rahmen der Resistenzentwicklung neu aufgetretene Mutationen auf DNA-Ebene zu detektieren, wurde die DNA der Zelllinien sowie ihrer resistenten Äquivalente mittels Next Generation Sequencing (NGS) analysiert.

Als einzige neu aufgetretene Mutation wurde in der Zelllinie HT29R eine Mutation im ATP-dependent helicase *ATRX* (*ATRX*) –Gen gefunden. Es handelt sich um eine Missense-Mutation – Austausch von Guanin gegen Thymin (c.512G>T) auf dem X-Chromosom in Position 76944393 im codierenden Teil des Exon 7 (Allelfrequenz: 21.8%; Abdeckung (coverage): 7581). Durch diese kommt es zu einem Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 171 auf Proteinebene (p.Cys171Phe).

Den Ergebnissen von Prädiktionsalgorithmen nach, ist die bei HT29R aufgetretene Mutation möglicherweise pathogen und mit Resistenz assoziiert ([https://varsome.com/variant/hg38/ATRX\(NM_000489.6\)%3Ac.512G%3ET?annotation-mode=somatic](https://varsome.com/variant/hg38/ATRX(NM_000489.6)%3Ac.512G%3ET?annotation-mode=somatic), Kopanos Christos et al. (2019)). Die Rolle dieser *ATRX*-Mutation lässt sich allerdings derzeit auf Grund fehlender klinischer Daten nicht abschließend beurteilen.

5.3 RNA-Sequenzierung

Basierend auf den Ergebnissen der DNA-Sequenzierung lässt sich schlussfolgern, dass die Entwicklung der Resistenzmechanismen nicht vorrangig auf genomischer (Mutationen und Amplifikationen in den untersuchten Genen) Ebene stattfindet, sodass in einem nächsten Schritt Expressionsveränderungen auf Transkriptomebene untersucht wurden.

Hierfür wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Um Expressionsunterschiede, die z.B. durch Zellkulturbedingungen oder die experimentelle Durchführung entstehen können, im Vorfeld der RNA-Sequenzierung zu reduzieren, wurden an zwei Zeitpunkten in jeweils 6 Replikaten jeweils 200.000/Zellen pro Loch in 6-Lochplatten ausplattiert. Nach RNA-Isolierung wurde mittels RT-qPCR der Gene *ECAD*, *VIM* und *TYMS* sichergestellt, dass die gewonnenen Proben eine vergleichbare Genexpression aufweisen.

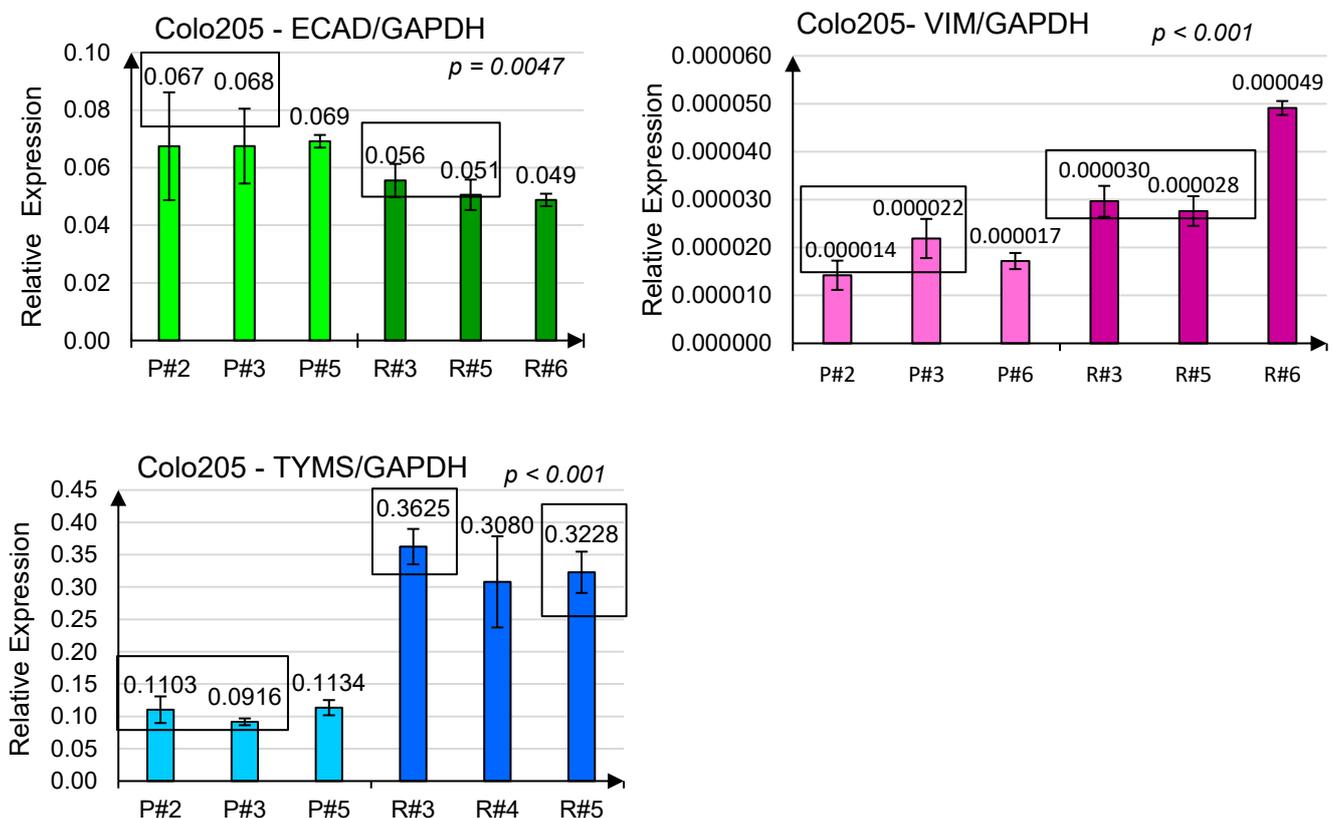


Abbildung 13: Validierung einer vergleichbaren Genexpression vor RNA-Sequenzierung

Expression der Gene *ECAD*, *VIM* und *TYMS* zur Auswahl der RNA-Proben; qRT-PCR für die Gene (a) *ECAD*, (b) *VIM* und (c) *TYMS* am Beispiel der Zelllinie Colo205; Es wurden pro Zelllinie zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Von jeder Zelllinie wurden pro Experiment sechs technische Replikate erstellt, wobei drei Ausführungen der qPCR pro technischem Replikat erfolgten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Messwerten an. Der p-Wert, Vergleich P vs. R ist das Ergebnis des ungepaarten t-Tests. Ausgewählte RNA-Proben markiert.

Für die Sequenzierung wurde die RNA von jeweils zwei vergleichbaren technischen Replikaten aus den zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen ausgewählt – je 4 Proben pro Zelllinie. Insgesamt wurde die RNA von 24 Proben verwendet. Die Erstellung der Library für die Sequenzierung der Poly(A)-RNA erfolgte mit einer angepassten Version des von Soumillon et al. (2014) zuvor beschriebenen Protokolls (siehe auch 4.6) und wurde von Hr. Sebastian Heucke durchgeführt. Die Sequenzierung der Library wurde im Genzentrum München, Arbeitsgruppe Dr. H. Blum auf einer Illumina HiSeq1500 durchgeführt.

5.3.1 Qualitätssicherung

Zur weiteren Datenanalyse wurden die erhaltenen Sequenzierdaten (Base-Call (BCL)-Dateien) mit der Illumina bcl2fastq2 Conversion Software v2.20 in FASTQ-Dateien konvertiert. Für die folgende bioinformatische Datenanalyse wurden die erzeugten FASTQ-Dateien anschließend auf die Galaxy-Plattform (<https://usegalaxy.eu/>) hochgeladen.

Vor dem Alignment wurde eine Qualitätskontrolle der Sequenzierung mit dem „FastQC“ und „MultiQC“-Tool auf der Galaxyplattform (<https://usegalaxy.eu/>) durchgeführt (Andrews, n.d.; Ewels et al., 2016). Der Phred-Score, welcher die Wahrscheinlichkeit, dass eine Base korrekt erkannt wurde, repräsentiert, zeigt sich für alle Proben bei über 30 (Abbildung 14). Generell wird eine untere Grenze des Phred-Score von 20 angewandt, bei welchem die betroffenen Basen herausgefiltert werden sollten (Sathyanarayanan et al., 2019).

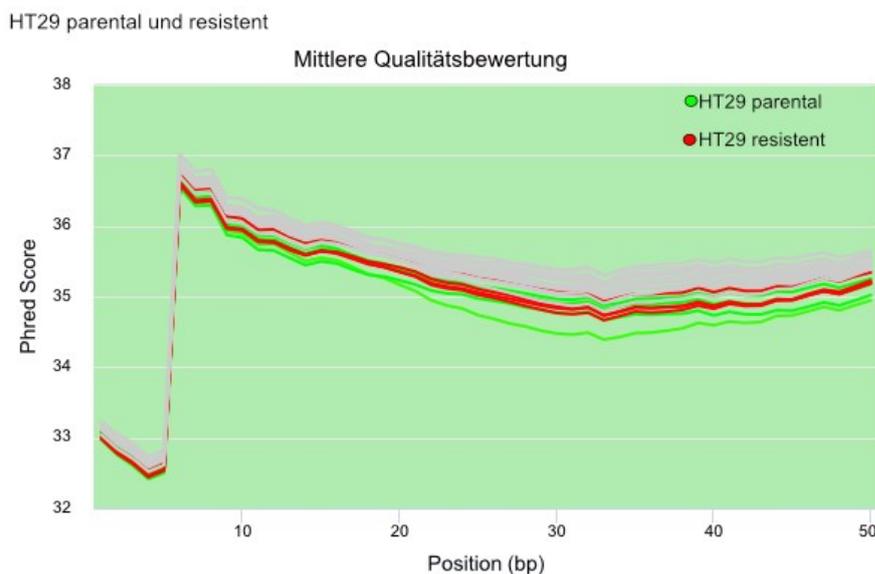


Abbildung 14: Phred-Score am Beispiel der Zelllinie HT29

Der Inhalt pro Basensequenz (Per base sequence content) stellt das Verhältnis jeder der vier DNA-Basen an jeder Position dar. Es ist bekannt, dass bei RNA-Sequenzierungsbibliotheken durch verzerrte RNA Fragmentation eine technische Selektionsverzerrung in

den ersten 12 Basenpaaren entsteht. Dies kann durch Trimmen nicht korrigiert werden, aber beeinträchtigt die nachfolgende Analyse in keiner Weise (Andrews, n.d.).

Hier zeigte sich der Inhalt pro Basensequenz in den ersten 10-15 Nukleotiden wie erwartet nicht-uniform verteilt. Ab Base 15 zeigten sich der Anteil jeder der vier Basen über die Länge des Read mit %A=%T und %G=%C weitestgehend konstant (Abbildung 15).

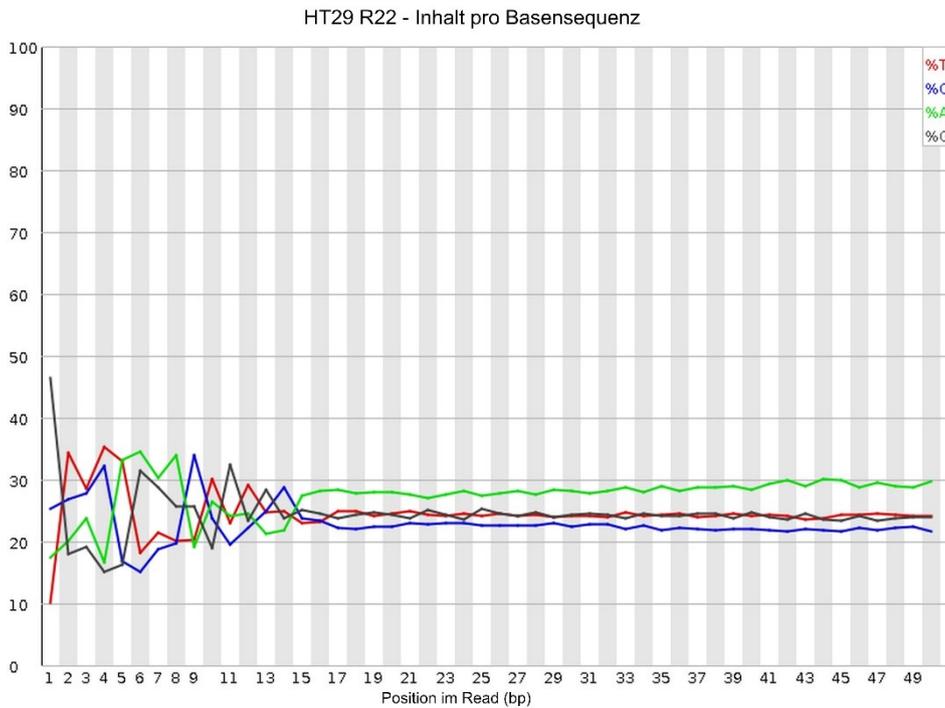


Abbildung 15: Inhalt pro Basensequenz am Beispiel von HT29R22

Das Diagramm der GC-Verteilung der RNA-Sequenzierungsbibliothek zeigte nahezu eine Normalverteilung, womit eine höhergradige Kontamination der Library ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 16).

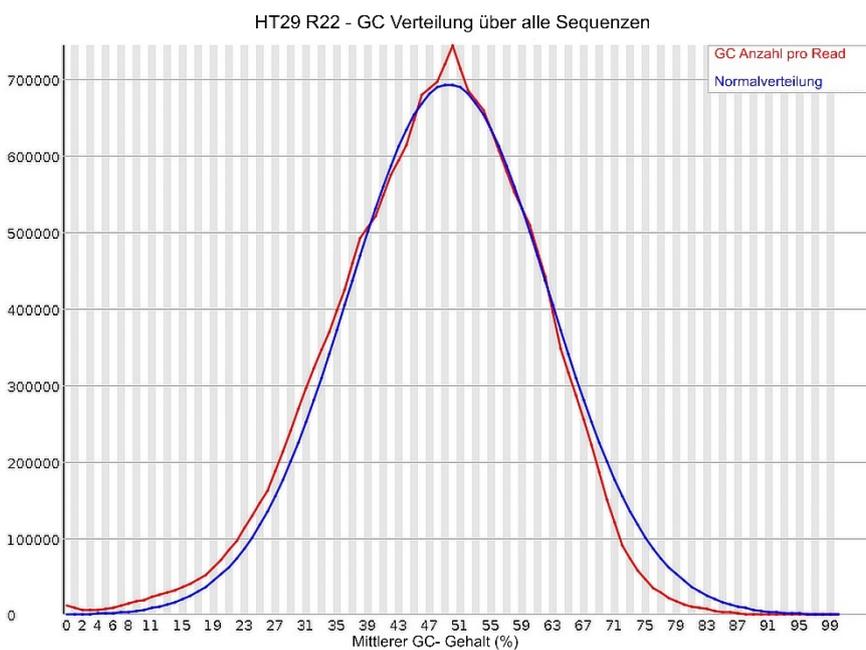


Abbildung 16: GC-Verteilung der Sequenzierungsbibliothek am Beispiel von HT29R22

Der sog. „N-Content“, der den Anteil der Basen zeigt, welche der Sequenzer nicht mit ausreichender Sicherheit erkannt hat, ist über alle Positionen des Reads $< 1\%$.

Es lagen Sequenzduplikationen vor. Die Erklärung hierfür ist, dass in RNA-Sequenzierungsbibliotheken die Sequenzen verschiedener Transkripte in sehr unterschiedlichen Mengen vorhanden sind. Um niedrig exprimierte Transkripte beobachten zu können, müssen auch hoch exprimierte Transkripte übersequenziert werden, was zu einer großen Anzahl von Duplikaten führen kann. Dies führt zu einer hohen Gesamtduplikation, vor allem in den höheren Duplikationsbereichen. Doppelte Reads für Transkripte mit hoher Menge können erwartet werden. Eine Untersuchung der Duplikationsverteilung auf die zugehörige genomische Region könnte zwischen technischer Duplikation und Übersequenzierung unterscheiden, ist allerdings mit FastQ-Rohdaten nicht möglich (Andrews, n.d.; RTSF-Genomics-Core).

Der Anteil der Adaptersequenzen in der durchgeführten Sequenzierung war normal, keine Sequenz zeigte sich im Gesamtanteil der Reads häufiger als 5%.

Hinsichtlich der überrepräsentierten Sequenzen listen die Programme MultiQC und FastQC alle Sequenzen auf, die mehr als 0.1% der Gesamtmenge ausmachen. Zurückzuführen waren der Großteil der aufgetretenen überrepräsentierten Sequenzen, bei Betrachtung der FastQC-Ergebnisse der einzelnen Proben, auf den Illumina® Single End PCR Primer. Hierdurch konnten die Ergebnisse der Sequenzduplikation erklärt werden. Dieser Effekt verminderte sich deutlich bei Deduplikation.

Bei einem Gesamtanteil an überrepräsentierten Sequenzen von $< 0.1\%$ bis max. 1.3% wurde die Analyse der Sequenzierung mit allen Proben fortgeführt.

5.3.2 Verarbeitung der FastQ Dateien zu rohen Zählraten

Auf dem LAFUGA-Galaxy Server der AG Blum (Labor für funktionelle Genomanalyse (LAFUGA) des Genzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München) wurden die ersten Verarbeitungsschritte der FastQ-Daten von Dr. Julia Philippou-Massier durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Sequenzierungsdaten dekomprimiert und die Datenspuren von interessierender Sequenz (sequence of interest, SOI) und Barcode verkettet (Gruening, 2014). Die Analyse wurde ohne Beachtung der eindeutigen molekularen Identifikatoren (unique molecular identifier, UMI) durchgeführt, da davon ausgegangen werden kann, dass aus Mengengründen der PCR-Duplikationsfehler im Unterschied zur Einzel-Zell-RNA-Sequenzierung bei einer Bulk-Sequenzierung weniger relevant ist.

Im Anschluss erfolgte das Zuordnen der Sequenzen zu der jeweiligen Probe unter Verwendung der Barcode-Information. Hierfür wurde das Tool „Je-Demultiplex“ (Girardot et al., 2016) verwendet.

Das Mapping der Sequenzierungs-Reads auf das Referenzgenom GRCh38 (Genome Reference Consortium Human Build 38) erfolgte mit dem STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) -Softwarepaket (Dobin et al., 2012). Der Anteil der eindeutig zugeordneten Reads zeigte sich zwischen 69.59% und 74.08%.

Mit dem Python-Paket HTSeq wurde auf der Galaxy Platform die Anzahl der gemappten Reads für jedes Gen berechnet (Roh-Expressionsdaten) (Anders et al., 2014), wobei von den drei verschiedenen Overlap-Auflösungs- Modi der empfohlene Standard „union“ angewandt wurde.

5.3.3 Von rohen Zählraten zu Genen: Analyse der unterschiedlich exprimierten Gene mit Limma-Voom

Um die Gene zu identifizieren, die in den resistenten Subzelllinien Colo205R, HT29R und SW480R im Vergleich zu ihren parental Ausgangszelllinien über- oder unterexprimiert sind, wurde eine Limma-Voom Analyse durchgeführt (Law et al., 2014; Liu et al., 2015; Phipson et al., 2016; Ritchie et al., 2015). Über den Galaxy.eu Server wurden hierfür die Bioconductor-Softwarepakete limma (Smyth, 2005) und edgeR (Robinson et al., 2010) verwendet.

Da ein Gen auf einem bestimmten Mindestniveau exprimiert werden muss, bevor es biologische Relevanz hat, wurden Gene mit sehr niedrigen Counts vor Ausführung des Limma-Voom Pakets anhand eines Mindestschwellenwerts für die Anzahl pro Millionen (minimum CPM) herausgefiltert (Law et al., 2016). Entsprechend der Limma-Benutzeranleitung wurde die minimal gelesene Anzahl (read counts) von 10 in mindestens zwei Proben festgelegt. Die Proben wurden gewichtet, um den Einfluss der Ausreißerproben auf die statistische Berechnung herunterzugewichten, ihre Information jedoch beizubehalten (Liu et al., 2015). Für die Berechnung der effektiven Library-Größe und Normalisierung der rohen Zählraten wurde die TMM (Trimmed mean of M-values) -Methode verwendet (M. D. Robinson & A. Oshlack, 2010).

Die TREAT-Methode (t-tests relative to a threshold) als Erweiterung der empirischen Bayes t-Statistik (Smyth, 2004) wurde angewandt. Damit wird untersucht, ob der wahre Expressionsunterschied größer als der festgelegte Grenzwert ist, indem Letzterer in einen Hypothesentest eingesetzt wird. Hiermit kann im Vergleich zur konventionellen t-Statistik

eine möglichst niedrige Falscherkennungsrate (False discovery rate, FDR) erzielt werden (McCarthy & Smyth, 2009).

Zusätzlich wurde die Ermittlung der differentiell exprimierten Gene (DEGs) durch robuste Hyperparameter Schätzung verbessert. Hierdurch wird in der Prioritätsverteilung das Gewicht für hypervariable Gene vermindert, sodass diese nicht fälschlicherweise als DEGs identifiziert werden und gleichzeitig das Gewicht für andere Gene erhöht (Phipson et al., 2016).

Als Definition für signifikant unterschiedlich exprimierte Gene wurden folgende Grenzwerte festgelegt: $\log_2\text{-fold change (logFC)} \geq 1$ und adjustierter $p < 0.05$. Als p Anpassungsmethode für multiples Testen wurde die Methode von Benjamini und Hochberg (BH) zur Kontrolle der Falschentdeckungsrate in Höhe von 5% für alle Gene verwendet (Benjamini & Hochberg, 1995).

Für jedes Zelllinienpärchen – resistente gegen parentale Zelllinie – wurde mit oben genannten Parametern die Limma-voom Analyse durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA), welche die Unterschiede zwischen den Proben in Bezug auf die Genexpression repräsentiert.

In der Übersicht (Abbildung 17) zeigt sich, dass sich die Proben der parentalen Zelllinien deutlich von denen der resistenten Zelllinien unterscheiden, sodass daraus geschlossen werden kann, dass der Haupt-Unterscheidungsfaktor zwischen den Äquivalenten der Resistenzmechanismus ist.

Bei der Zelllinie Colo205 (Abbildung 17a) clustern alle vier parentalen und zwei der vier resistenten Proben zusammen. Im PCA-Diagramm der Zelllinie HT29 (Abbildung 17b) sind drei der vier parentalen und zwei der vier resistenten Proben nahe zusammen gruppiert. In SW480P (Abbildung 17c) clustert eines der beiden biologischen Replikate zusammen. Bei Colo205, HT29 und SW480P wurden die nicht nahe zusammen gruppierenden Replikate aus der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Sowohl die technischen als auch die biologischen Replikate von SW480R gleichen sich nur in der Hauptkomponente 1. Für die weitere Analyse wurden daher vier der vier Proben verwendet. Zusammengefasst wurden anhand der PCA sieben der 24 Proben aus der Berechnung der DEGs ausgeschlossen.

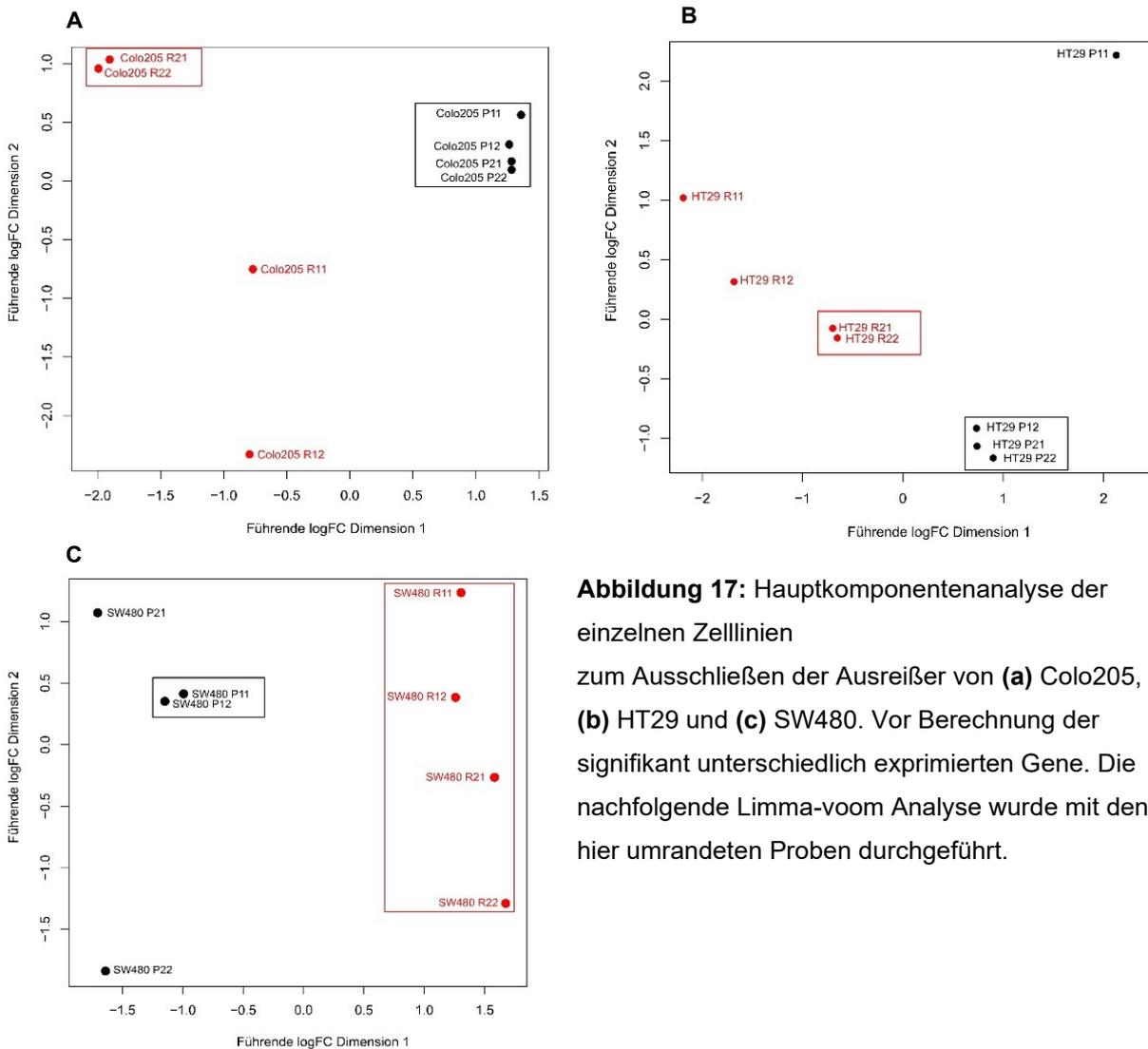


Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse der einzelnen Zelllinien zum Ausschließen der Ausreißer von (a) Colo205, (b) HT29 und (c) SW480. Vor Berechnung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene. Die nachfolgende Limma-voom Analyse wurde mit den hier umrandeten Proben durchgeführt.

Die PCA aller Zelllinien zeigte, dass die parentalen und resistenten Proben von HT29 und SW480 in einem Cluster zusammengefasst sind (Abbildung 18). Daraus lässt sich schließen, dass sich das globale Genexpressionsprofil mit Erwerb des FOLFIRI-resistenten Phänotyps nicht verändert hat und die resistenten Subzelllinien nicht als eigenständige Einheit, sondern als isogene Zelllinienvarianten betrachtet werden können. Bei Colo205 zeigt sich zwischen P und R eine größere Entfernung, was darauf hindeutet, dass die mit der Chemotherapieresistenz verbundenen Veränderungen das globale Expressionsprofil der Zellen im Vergleich zu

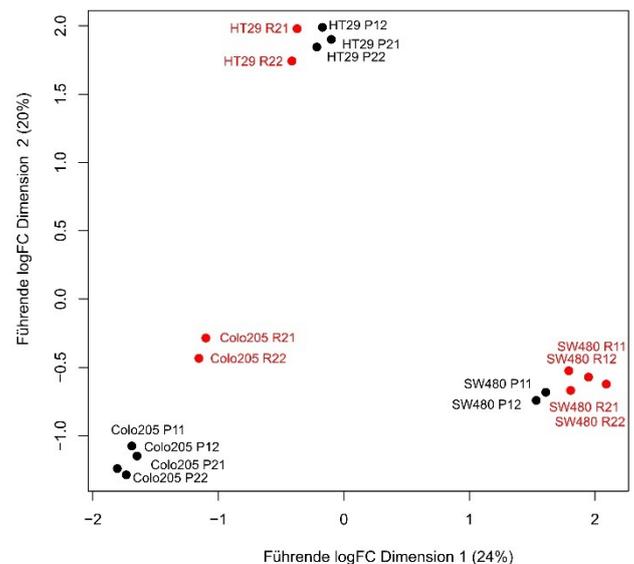


Abbildung 18: PCA aller Zelllinien Hauptkomponentenanalyse aller Proben, die zur weiteren Berechnung verwendet wurden

HT29 und SW480 stärker verändert haben. Dazu passt auch die höhere Anzahl an signifikant differentiell regulierten Genen: Bei Colo205 ergab sich eine Anzahl von 223 DEGs, für HT29 47 DEGs und für SW480 30 DEGs (Abbildung 19).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Expressionsveränderungen in mehreren Zelllinien vorliegen, da diese möglicherweise ein Hinweis für einen gemeinsamen Resistenzmechanismus darstellen (Abbildung 19, Tabelle 16).

Die Expression von zwei Genen lag in allen drei Zelllinien signifikant verändert vor. Die Transkription für Gelsolin (*GSN*), ein Actin-bindendes Protein (Feldt et al., 2019), zeigte sich in den drei Zelllinien als signifikant erhöht mit einer logFC von 2.15 bei HT29 ($p_{\text{adj}}=7.02 \times 10^{-6}$), 2.51 bei SW480 ($p_{\text{adj}}=8.78 \times 10^{-4}$) und 3.22 bei Colo205 ($p_{\text{adj}}=8.38 \times 10^{-9}$). Die Expression von *TACST2* (tumor associated calcium signal transducer 2) war in Colo205 ($p_{\text{adj}}=0.0147$), und SW480 ($p_{\text{adj}}=0.0284$) erhöht, in HT29 dagegen signifikant ($p_{\text{adj}}=0.0351$) vermindert. In Colo205 und HT29-resistenten Zelllinien waren 7 Gene übereinstimmend erhöht exprimiert, während zwischen Colo205 und SW480 nur zwei DEGs übereinstimmten. Keratin 17 (*KRT17*) ist das einzige übereinstimmende DEG bei HT29 und SW480 (HT29: logFC: 3.00, $p_{\text{adj}}=0.0130$, SW480: logFC: 3.38, $p_{\text{adj}}=0.02$) (Tabelle 16).

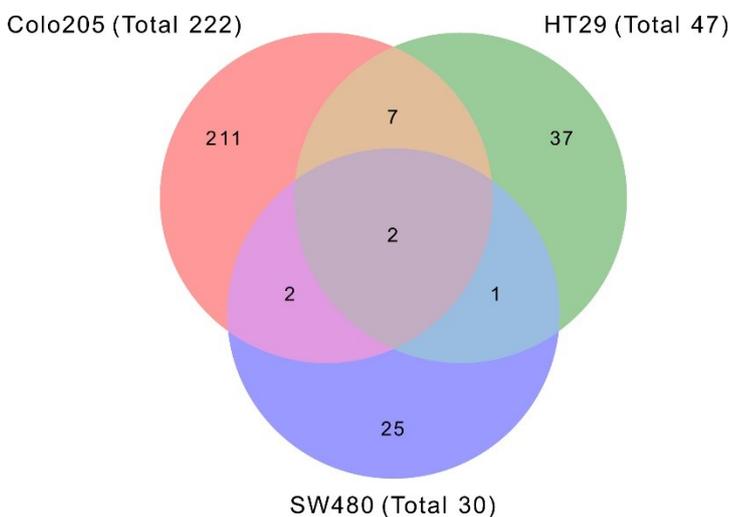


Abbildung 19: Venn-Diagramm der DEGs der Zelllinien Colo205, HT29 und SW480

Gen	logFC Colo205	logFC HT29	logFC SW480	<i>p</i> -adj. Colo205	<i>p</i> -adj. HT29	<i>p</i> -adj. SW480
Colo205 + HT29 + SW480						
<i>GSN</i>	3.22	2.15	2.51	8.38 x10 ⁻⁹	7.02 x10 ⁻⁶	8.78 x10 ⁻⁴
<i>TACSTD2</i>	1.62	-1.86	2.70	1.47 x10 ⁻²	3.51 x10 ⁻²	2.84 x10 ⁻²
SW480 + Colo205						
<i>CEACAM6</i>	4.70	1.71	5.21	1.52 x10 ⁻⁰⁴	ns	2.20 x10 ⁻²
<i>FXVD3</i>	2.19	0.28	2.88	1.07 x10 ⁻⁰⁵	ns	1.75 x10 ⁻⁰⁵
Colo205 + HT29						
<i>ANXA13</i>	3.30	5.52	-0.28	1.02 x10 ⁻²	2.95 x10 ⁻⁴	ns
<i>CAV2</i>	2.82	2.73	1.19	1.45 x10 ⁻²	3.26 x10 ⁻³	ns
<i>CCL5</i>	5.79	3.63	-1.11	9.28 x10 ⁻⁴	1.08 x10 ⁻²	ns
<i>CD55</i>	3.38	2.37	2.32	1.44 x10 ⁻²	1.31 x10 ⁻⁴	ns
<i>MMP7</i>	4.91	1.52	0.22	2.43 x10 ⁻⁸	1.72 x10 ⁻²	ns
<i>PERP</i>	1.27	1.51	0.96	9.23 x10 ⁻⁴	1.11 x10 ⁻³	ns
<i>S100A4</i>	2.19	-2.06	0.23	2.15 x10 ⁻¹²	2.93 x10 ⁻¹²	ns
SW480 + HT29						
<i>KRT17</i>	1.44	3.00	3.38	ns	1.30 x10 ⁻²	2.00 x10 ⁻²

Tabelle 16: LogFC und *p*-Werte der übereinstimmenden DEGs

ns = nicht signifikant. LogFC, log2 fold change. *p*adj, adjustierter *p*-Wert

5.3.4 Einteilung der Signaturgene der Zelllinien nach funktionellen Merkmalen

Die GeneOntology (GO)-Klassifikation unterteilt die Eigenschaften von Genen und Genprodukten in drei Kategorien: Biologischer Prozess (BP), molekulare Funktion (MF) und Zellkomponente (CC) (Ashburner et al., 2000).

Um die 12 DEGs nach genannten Kategorien zu charakterisieren, wurde eine Genontologieanalyse mit PANTHER V.17.0 (protein annotation through evolutionary relationship), einer umfangreichen Ressourcenbibliothek zur Systematisierung von Genen nach ihrer evolutionären Abstammung und ihren Funktionen, sowie der humanen Gendatenbank durchgeführt (Safran et al., 2021; Thomas et al., 2003). Gemäß der GeneOntology-Klassifikation können die DEGs wie folgt charakterisiert werden: (Tabelle 17):

Genname	Proteinklasse	Molekulare Funktion (Auswahl aus GO Datenbank)
<i>GSN</i>	Aktin-bindendes Protein	Aktin-Filament Bindung, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat Bindung
<i>TACSTD2</i>	Zelloberflächenrezeptor	Signalrezeptoraktivität: Weiterleitung von Kalziumsignalen

<i>CEACAM6</i>	Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie	Zelladhäsionsmolekül: Proteinbindung
<i>FXYD3</i>	Primärer aktiver Transporter	Molekularer Funktionsregulator: Ionenkanalregulator
<i>ANXA13</i>	Zytoplasmatisches kalziumbindendes Protein	Kalziumbindung, Phosphatidylserin-Bindung
<i>CAV2</i>	Gerüst-/Adaptorprotein	Hauptbestandteil der inneren Oberfläche von Caveolae; Adaptor- und Homodimerisierungsaktivität
<i>CCL5</i>	Zytokin	Molekularer Funktionsregulator und Transducer-Aktivität als Zytokin
<i>CD55</i>	Komplementbestandteil	Lipid- und Proteinbindung; Regulation der Komplementkaskade
<i>MMP7</i>	Metalloprotease	Metalloendoprotease
<i>PERP</i>	Bestandteil der interzellulären Desmosomen-Verbindung	Proteinbindung
<i>S100A4</i>	Zytoplasmatisches kalziumbindendes Protein	Regulator von zellulären Prozessen; RNA Bindung, Kalziumionbindung, Proteinbindung
<i>KRT17</i>	Intermediärfilament	Strukturmolekülaktivität

Tabelle 17: Ergebnisse der Genontologie-Analyse mit PANTHER und der Gendatenbank GeneCards

Es ist bemerkenswert, dass zwei zytoplasmatische kalziumbindende Proteine, *S100A4* und *ANXA13*, hochreguliert wurden, und zwar zusammen mit *TACSTD2*, einem Zelloberflächenrezeptor, der Kalziumsignale weiterleitet. Dies kann als Anzeichen für die Aktivierung eines kalziumabhängigen Signalweges gedeutet werden, auch wenn bisher ein etablierter Signalweg noch nicht beschrieben worden ist.

In einem nächsten Schritt wurde eine Gensatzanreicherungsanalyse (GSEA) durchgeführt (Mootha et al., 2003; Aravind Subramanian et al., 2005), um zu ermitteln, welchen Gensets die Expressionsprofile der drei Zelllinien in der Genset-Sammlung "Hallmarks", welche die Genexpressionssets der grundlegenden molekularen und Krebs-assoziierten Mechanismen enthält, zugeordnet werden können.

Hallmark Gensets	SIZE ¹	SIZE	SIZE	NES ²	NES	NES	FDR ³	FDR	FDR
	Colo205	HT29	SW480	Colo205	HT29	SW480	Colo205	HT29	SW480
TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	151	154	161	2.27	1.71	1.7	0	0.019	0.023
KRAS_SIGNALING_UP	109	110	117	2.18	1.77	1.31	0	0.017	0.212
IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	52	50	54	1.81	1.41	1.42	0	0.105	0.122
INFLAMMATORY_RESPONSE	97	95	98	1.61	1.50	1.39	0.01	0.061	0.142
COAGULATION	60	61	73	1.55	1.53	1.34	0.02	0.052	0.175
ESTROGEN_RESPONSE_LATE	155	153	163	1.36	1.33	1.47	0.089	0.199	0.087
KRAS_SIGNALING_DN	67	63	76	1.25	1.24	1.51	0.185	0.24	0.093

¹ Anzahl der Gene, die im Expressionsdatensatz enthalten sind

² Normalized Enrichment Score (normalisierter Anreicherungs-score)

³ False Discovery rate (Falsch-Entdeckungsrate)

Tabelle 18: Ergebnisse der funktionellen Genset-Anreicherungsanalyse mittels GSEA unter Verwendung der „Hallmark“ Datensätze.

Es ergab sich, bei Einsetzen aller Gene der jeweiligen Zelllinien in die GSEA-Anreicherungsanalyse, in allen drei Zelllinien eine Hochregulierung der in Tabelle 18 genannten Krebs-assoziierten Hallmark- Gensets: Insbesondere dem Genset „TNF- α signaling via NF- κ B“ sowie dem KRAS-Signalweg (Liberzon et al., 2015; Aravind Subramanian et al., 2005) können die Genexpressionsprofile als mKRK-Pathomechanismus zugeordnet werden. Dass diese Gene und deren Zusammenspiel (Tago et al., 2019) für die Entwicklung und Progression kolorektaler Karzinome relevant sind, ist bereits in zahlreichen vorangegangenen Studien beschrieben (Misale et al., 2012; Wang et al., 2009; Xia et al., 2014).

Im Anschluss wurde die Anreicherungsanalyse mit den selektierten DEGs der einzelnen Zelllinien durchgeführt, um zu überprüfen, ob die DEGs der Zelllinien einer bestimmten biologischen Funktion bzw. Fähigkeit zugeordnet werden können.

Es ergab sich eine Hochregulierung für die Gensets HALLMARK_KRAS_SIGNALING-UP“, „HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING“ (Liberzon et al., 2015; Mootha et al., 2003; Aravind Subramanian et al., 2005) bei HT29 (Tabelle 19). Der geringen Anzahl an Proben und Genen geschuldet, wird eine FDR von unter 25% nur bei den Gensets „HALLMARK-KRAS-SIGNALING-UP“ und „HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING“ bei HT29 erreicht. In SW480 und Colo205 ergab die Anreicherungsanalyse der DEGs mittels GSEA kein relevantes differentiell reguliertes Hallmark-Genset, jedoch scheint der KRAS-Signalweg eine gewisse Relevanz für Colo205 und HT29 (insgesamt 15 DEGs) zu besitzen. Bei unsicherer bzw. fehlender Signifikanz wurde auf die Fortführung der Analyse weiterer, spezieller Genset-Sammlungen verzichtet.

Genset	HT29 47 DEGs			Colo205 222 DEGs		
	SIZE ¹	NES ²	FDR ³	SIZE	NES	FDR
KRAS_SIGNALING_UP	3	1.77	0.017	12	1.46	1.00
IL2_STAT5_SIGNALING	3	1.47	0.143	ns		

¹ Anzahl der Gene, die im Expressionsdatensatz enthalten sind

² Normalized Enrichment Score (normalisierter Anreicherungsscore)

³ False Discovery rate (Falsch-Entdeckungsrate)

Tabelle 19: Ergebnisse der funktionellen Genset-Anreicherungsanalyse der DEGs: Signifikante Hochregulierung zweier Gensets bei HT29

5.4 Vergleich und Erweiterung der zellulären Gensignatur mit dem klinischen Datenset GSE62322

Im nächsten Schritt wurde überprüft, inwieweit die auf Zellkulturebene identifizierten relevanten Gene mit klinischen Expressionsdaten korrelieren. Hierfür wurde eine Suche nach klinischen Expressionsdatensätzen in der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank durchgeführt, die eine FOLFIRI-Resistenz (Nicht-Ansprechen) widerspiegeln (Clough & Barrett, 2016). Nur der Datensatz GSE62322 enthielt die entsprechenden Expressions- und klinischen Angaben.

In dieser Studie von Del Rio et al. (2007) wurden Tumorproben von 21 chemotherapie-naiven Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem Kolorektalkarzinom entnommen. Nach R0 Resektion erhielten die Patienten FOLFIRI als Erstlinien-Chemotherapie. Folgende Protokolle wurden verwendet: 10 Patienten erhielten das LV5FU2 Protokoll mit

zusätzlich Irinotecan (FOLFIRI): Leucovorin: 200 mg/m², Irinotecan: 180mg/m², 5-FU: 400mg/m² als Bolus plus 2.4mg/m² 5-FU als 46-stündige Infusion, 10 Patienten erhielten FOLFIRI mit einer erhöhten Irinotecandosis von 260mg/m² und ein Patient erhielt 5-FU per os. Das Ansprechen wurde vor und nach vier Chemotherapie-Zyklen für Protokolle mit 3-Wochen-Zyklen und nach allen sechs Zyklen für Protokolle mit 2-Wochen-Zyklen beurteilt. Ein Rückgang von $\geq 50\%$ der Metastasen wurden als Ansprechen (Responder, R) eingestuft, Patienten mit einem Rückgang von weniger als 50% oder mit Größenprogression wurden als Nicht-Ansprecher (Non-Responder, NR) klassifiziert (Del Rio et al., 2007).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die DEGs der Zelllinien (Colo205: 222 Gene, HT29: 47 Gene, SW480: 30 Gene) in den Primärtumorproben (PT) der NR-Gruppe analog zu den resistenten Subzelllinien ebenfalls signifikant unterschiedlich im Vergleich zu der R-Gruppe exprimiert wurden.

Es wurden die Expressionswerte der pro Zelllinie signifikanten Gene aus dem Datensatz extrahiert. Für 98 Gene der insgesamt 284 DEGs der Zelllinien (Colo205: 78/222 Genen, HT29: 16/47 Genen, SW480: 9/30 Genen) wurden Expressionswerte gefunden. Bei der Überprüfung welche der 12 DEGs (vgl. Tabelle 16) in dem Datenset enthalten sind, fiel auf, dass lediglich Expressionswerte für die Gene *GSN*, *TACSTD2* und *PERP* vorliegend sind. Aufgrund dessen kann hinsichtlich der übrigen neun Gene keine Aussage über die Vergleichbarkeit der Expression getroffen werden.

Nach gleichem Schema wurde für die Primärtumorproben – 11 NR-Proben gegen 9 R-Proben – eine Limma-voom Analyse durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit einer Einzel-Zählmatrix aller 98 Gene mit dem „Limma-voom“ Paket auf der Galaxy Plattform sowie, als Kreuzvalidierung, auf dem Webserver MR4-Cancer (Master-Regulator for Cancer; <http://cis.hku.hk/MR4Cancer/>). MR4-Cancer wendet als zugrundeliegende Rechenmethode für die Expressionsanalyse ebenfalls das Limma-voom-Paket an (Ru et al., 2019). Die Gene *GSN*, *TACSTD2* und *PERP* der Zelllinien zeigten sich in der differentiellen Expressionsanalyse nicht signifikant ($\log_{FC} = > 1$ und $p = < 0.05$).

Gen	logFC	<i>p</i>	<i>p</i> _{adj}
<i>GSN</i>	0.19	0.63	0.90
<i>TACSTD2</i>	-0.46	0.11	0.67
<i>PERP</i>	-0.0026	0.99	0.99

Tabelle 20: Ergebnisse der Limma-Analyse für die Gene *GSN*, *TACSTD2* und *PERP*

Berechnet mit den Expressionsdaten des Datensets GSE62322 auf dem EU-Galaxy-Server

Als signifikant zeigten sich überschneidend die Gene für *TNC* (Tenascin C), *EIF4E3* (Eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3), *SERPINE2* (Serpin family E member 2) und *TSC22D1* (TSC22 domain family member 1). Die *p*-Werte für *ASCL2* (Achaete-scute family BHLH transcription factor 2, $p_{MR4C} = 0.066$), *CTSC* (Cathepsin C, $p_{MR4C} = 0.10$) und *STX3* (Syntaxin 3, $p_{MR4C} = 0.051$) liegen in der Berechnung von MR4-Cancer mitunter knapp oberhalb des Signifikanzniveaus. Ebenso die Gene *CHST11* (Carbohydrate sulfotransferase 11, $p_{Galaxy} = 0.088$) und *RGS5* (Regulator of G Protein-signaling 5, $p_{Galaxy} = 0.070$) in der Berechnung von Galaxy.

Darüber hinaus als sich überschneidende Gene hervorzuheben sind *NEDD9* (Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 9, $p_{Galaxy} = 0.053$, $p_{MR4C} = 0.058$), *RGS5* (Regulator of G protein signaling 5, $p_{Galaxy} = 0.070$, $p_{MR4C} = 0.048$) und *STX3* (Syntaxin 3, $p_{Galaxy} = 0.031$, $p_{MR4C} = 0.051$). Diese sind bei vorliegender FOLFIRI-Resistenz ebenfalls sowohl auf Zellkulturebene als auch im vorliegenden klinischen Datenset differenziell reguliert und scheinen daher einen wichtigen Trend anzudeuten, der weiterer Forschung bedarf.

Übereinstimmend eine $\logFC \geq 1$ und ein $p < 0.05$ weisen die Gene *TNC* und *SERPINE2* auf (Tabelle 21).

Galaxy Limma-voom Analyse				MR4Cancer Limma-Voom Analyse			
Gensymbol	logFC	<i>p</i>	<i>p_{adj}</i>	Gensymbol	logFC	<i>p</i>	<i>p_{adj}</i>
<i>ASCL2</i>	0.73	0.0076	0.39	<i>EIF4E3</i>	-0.81	0.0132	0.50
<i>TNC</i>	-1.61	0.0122	0.39	<i>SERPINE2</i>	-1.28	0.0185	0.50
<i>CTSC</i>	0.69	0.0155	0.39	<i>TNC</i>	-1.61	0.0212	0.50
<i>EIF4E3</i>	-0.76	0.0160	0.39	<i>CHST11</i>	-0.58	0.0397	0.50
<i>SERPINE2</i>	-1.14	0.0266	0.49	<i>TSC22D1</i>	-0.63	0.0428	0.50
<i>STX3</i>	-0.54	0.0311	0.49	<i>RGS5</i>	-1.05	0.0477	0.50
<i>TSC22D1</i>	-0.56	0.0352	0.49	<i>STX3</i>	-0.6	0.0508	0.497
<i>NEDD9</i>	-0.41	0.0531	0.64	<i>FGF19</i>	-1.13	0.0575	0.497
<i>ST3GAL1</i>	-0.58	0.0589	0.64	<i>NEDD9</i>	-0.55	0.0583	0.497
<i>RGS5</i>	-0.91	0.0697	0.67	<i>HSPA5</i>	-0.64	0.0584	0.497

Tabelle 21: Limma-Analyse der Expressionsdaten des Datensets GSE62322 der 98 DEGs der Zelllinien. Darstellung der auf *p* Niveau signifikanten (<0.05) Gene (kursiv) (a) Berechnung mit dem Limma-Paket auf dem Galaxy-Server (b) Berechnung auf dem Webserver MR4-Cancer (master regulator for cancer). Übereinstimmende Gene markiert, Darstellung knapp nicht-signifikanter Gene als Trend unterhalb der Doppellinie.

Diese Gene können gemäß GO-Klassifikation wie folgt charakterisiert werden (Safran et al., 2021; Thomas et al., 2003):

Gensymbol	Proteinklasse	Molekulare Funktion (Auswahl aus der GO Datenbank)
<i>SERPINE2</i>	Proteaseinhibitor	Signalrezeptorbindung Inhibitor von Serinproteasen
<i>TNC</i>	Protein der extrazellulären Matrix	Strukturbestandteil der extrazellulären Matrix Syntecanbindung Proteinbindung

Tabelle 22: Genontologie-Analyse mit PANTHER und der Gendatenbank GeneCards

Nach *p*-Korrektur (BH-Methode) zeigt sich keins der Gene als signifikant (Tabelle 21). Als Ursachen sind die geringe Anzahl (98 Gene) der sich überschneidenden Gene und die geringe Probenanzahl sowohl im Zellkulturmodell als auch in der Studie anzusehen. Die negative logFC bedeutet, dass die Genexpression in den Proben der Nicht-Ansprecher-Gruppe herunterreguliert worden ist. Dies wurde mit den Expressionsdaten der Zelllinien verglichen (Tabelle 23). Hierbei zeigte sich, dass *SERPINE2* in den HT29R Zellen analog

zu der NR-Gruppe herunterreguliert worden ist – aber nicht unter das adjustierte Signifikanzniveau fiel ($\log_{2}FC = -3.46$, $p = 0.0035$, $p_{adj.} = 0.40$). In Colo205R und SW480R Zellen wurde *SERPINE2* hingegen überexprimiert, wobei sich dies nur bei Colo205 als signifikant erwies ($\log_{2}FC = 6.99$, $p = 5.10 \times 10^{-5}$, $p_{adj.} = 1.38 \times 10^{-5}$).

<i>SERPINE2</i>	Colo205R	HT29R	SW480R
logFC	6.99	-3.46	2.07
p	5.1×10^{-8}	0.0035	0.0441
p_{adj}	1.38×10^{-5}	0.40	1.00
<i>TNC</i>			
logFC	3.62	nv	4.77
p	0.0008	nv	0.0039
p_{adj}	0.04	nv	0.36

Tabelle 23: Limma-voom Analyse (Galaxy) für *SERPINE2* und *TNC*

nv= nicht vorhanden

Im Gegensatz zu den Expressionsdaten des klinischen Datensets lag die Expression von *TNC* in den resistenten Äquivalenten von Colo205 und SW480 höher als in der jeweilig parental Zelllinie, wobei die Ergebnisse nur für Colo205 statistisch signifikant waren ($\log_{2}FC = 3.62$, $p = 0.0008$, $adj. p = 0.04$).

Zusammenfassend scheinen die Gene *SERPINE2* und *TNC* zusätzlich zu der 12-Gen Signatur der Zelllinien für die Resistenzentwicklung gegen FOLFIRI relevant zu sein.

5.5 Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der differenziell exprimierten Gene mit dem Kolon-Adenokarzinom (COAD) Datenset des Krebsgenomatlases (TCGA)

Um die Bedeutung der gefundenen DEGs für das Überleben von Kolorektalkarzinompatienten zu untersuchen, wurde als Nächstes eine Überlebenszeitanalyse auf der Grundlage der Expressionsdaten des Kolon Adenokarzinom (colon adenocarcinoma, COAD), bezogen aus dem cBioPortal ((Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013); www.cbioportal.org, abgerufen am 01. Mai 2022): Projekt: TCGA COAD, Projekt-ID: TCGA-AA-3715.), durchgeführt.

Die Analyse wurde mit 12 DEGs der Zelllinien plus den zwei DEGs der klinischen Expressionsdaten, *TNC* und *SERPINE2*, durchgeführt. Für die Etablierung der Gensignatur wurden folgende Auswahlkriterien festgelegt: Analog zu den Ergebnissen der Limma-Expressionsanalyse soll Überexpression mit kürzerem Gesamtüberleben (overall survival, OS) korreliert sein, da man davon ausgehen kann, dass eine Hochregulierung eines DEG in der resistenten Subzelllinie klinisch mit schlechterem Therapieansprechen und infolgedessen kürzerem Gesamtüberleben verbunden ist.

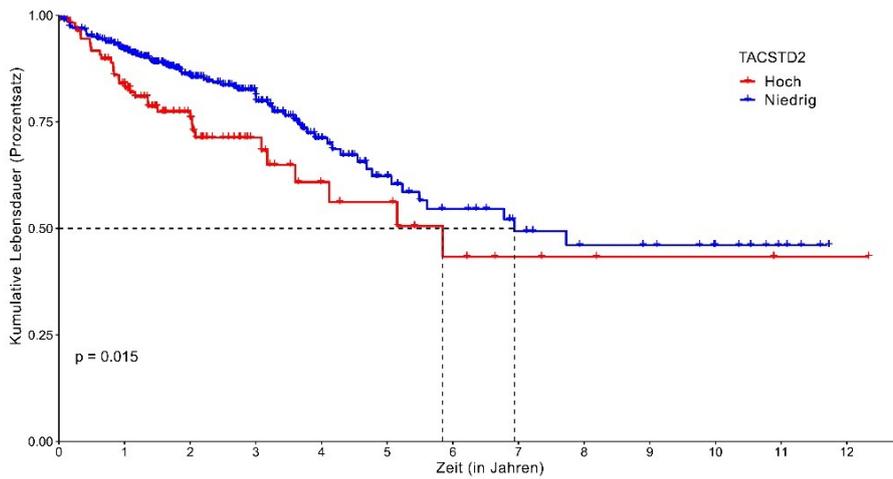
Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant gewertet und hinsichtlich der Verteilung der „Patienten unter Risiko“ ist die Patientenzahl pro Gruppe ≥ 100 festgelegt worden.

Passend zu den erhöhten Expressionen in den resistenten Subzelllinien zeigte die Überlebenszeitanalyse des COAD-Datensatzes, dass erhöhte Expressionslevel von *TACSTD2* (Hazard Ratio (HR)=1.64, $p=0.015$), *CAV2* (Caveolin-2; HR= 1.73, $p=0.022$) und *PERP* (HR=1.46, $p=0.044$) (P53 apoptosis effector related to PMP22) signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit einhergehen (Tabelle 24, Abbildung 20). Die erhöhte *SERPINE2* (HR=1.63, $p=0.027$) und *TNC* (HR=1.53, $p=0.034$) -Expression ist ebenfalls mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert (Supplementäre Abbildung 2, Supplementäre Abbildung 3 im Anhang). Wie in Abschnitt 5.4 gezeigt, wurde eine erhöhte *SERPINE2*- und *TNC*-Expression ebenfalls bei den Zelllinien Colo205 ($p_{adj} < 0.05$) und SW480 ($p < 0.05$) nachgewiesen.

Überlebenszeitanalyse				Expressionsanalyse							
	COAD (TCGA)			HT29		Colo205		SW480		GSE62322	
Gen	p_{adj}	HR	95% CI	logFC	p_{adj}	logFC	p_{adj}	logFC	p_{adj}	logFC	p_{adj}
<i>TACSTD2</i>	0.015	1.64	1.09 - 2.44	-1.86	0.035	1.62	0.015	2.70	0.028	-0.46	0.67
<i>CAV2</i>	0.022	1.73	1.08 - 2.78	2.73	3.26×10^{-3}	2.82	0.015	1.19	1.0	nv	nv
<i>PERP</i>	0.044	1.46	1.01 - 2.11	1.51	1.11×10^{-3}	1.27	9.23×10^{-4}	0.96	1.0	-0.003	0.99
<i>TNC</i>	0.034	1.53	1.03 - 2.27	nv	nv	3.62	0.04	4.77	0.36	-1.61	0.39
<i>SERPINE2</i>	0.027	1.63	1.05 - 2.51	-3.46	0.40	6.99	1.38×10^{-5}	2.07	1.00	-1.14	0.49

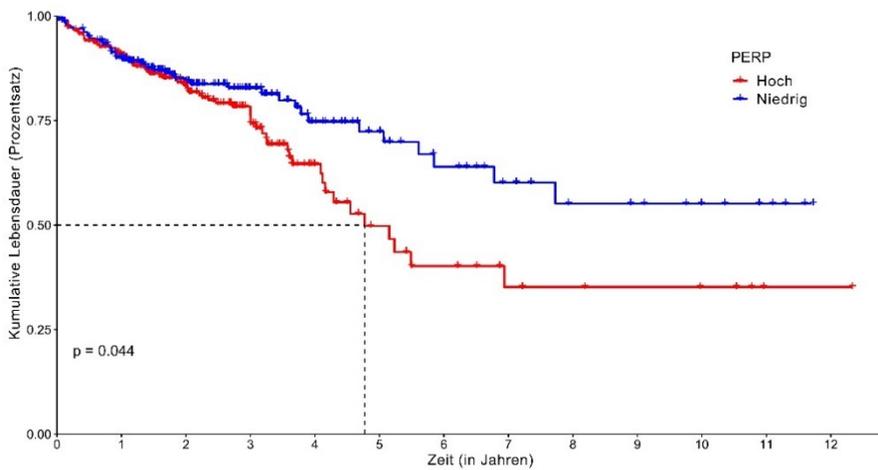
Tabelle 24: Übersichtstabelle: KM-Überlebenszeitanalyse und Expressionsanalyse

der eigenen RNA-Sequenzierung sowie des klinischen Datensets; CI = Konfidenzintervall, nv=nicht verfügbar



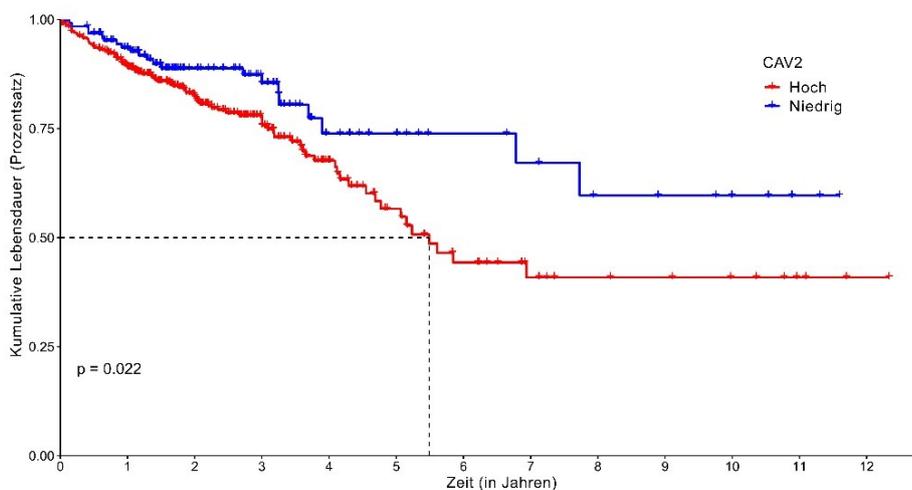
Patienten unter Risiko

TACSTD2 Hoch	118	84	51	24	13	11	6	4	3	2	2	1	1
TACSTD2 Niedrig	470	361	215	120	57	35	26	18	13	12	8	4	0
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Patienten unter Risiko

PERP Hoch	308	238	144	76	30	16	11	7	6	5	4	1	1
PERP Niedrig	280	207	122	68	40	30	21	15	10	9	6	4	0
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Patienten unter Risiko

CAV2 Hoch	448	336	197	99	50	30	20	12	9	8	6	3	1
CAV2 Niedrig	140	109	69	45	20	16	12	10	7	6	4	2	0
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für *TACSTD2*, *PERP* und *CAV2* Expressionsdaten des COAD Datensets (TCGA Datensatz bezogen von cBioPortal)

Durch die RNA-Sequenzierung eigener Zelllinien und durch die Analyse des klinischen Datensets GSE62322 konnte eine 15-Gensignatur etabliert werden. Von diesen 15 Genen konnten durch Verwendung des COAD-Datensets der cBioPortal-Datenbank 5 Gene ebenfalls mit OS assoziiert werden, sodass sich eine 5-Gen-Resistenzsignatur aus *TACSTD2*, *CAV2*, *PERP*, *TNC* und *SERPINE2* ergeben hat.

Hervorzuheben ist des Weiteren das Gen *GSN*, welches in allen drei resistenten Zelllinien signifikant überexprimiert war und bereits zuvor als Malignitätsfaktor bei KRK, allerdings ohne direkte Untersuchung der Rolle bei FOLFIRI-Resistenz, beschrieben wurde (Shieh et al., 1999; Zhuo et al., 2012). Allerdings war kein Abgleich im Datenset GSE62322 möglich und es wurde nur ein Trend ($p= 0.089$) hinsichtlich der Assoziation mit OS im TCGA Datensatz beobachtet.

Im nächsten Schritt wäre es wichtig, den Einfluss der Gene auf FOLFIRI-Resistenz und tumortreibende Mechanismen beispielsweise nach Gen-Knock-Down in Zelllinien zu validieren und im nächsten Schritt in einer größeren Patientenkohorte zu überprüfen.

6. Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war darauf ausgerichtet molekulare Mechanismen zu identifizieren, die es KRK-Zellen ermöglichen eine Chemotherapieresistenz gegen das FOLFIRI-Behandlungsregime aufzubauen, um die Grundlage für eine klinisch anwendbare FOLFIRI-Gensignatur zu etablieren.

Dazu wurde auch überprüft, inwieweit die auf zellulärer Ebene in der Resistenzsituation unterschiedlich exprimierten Gene auf klinische Expressions- und Überlebenszeitdaten übertragbar sind.

Die experimentelle Vorgehensweise untergliederte sich in drei Abschnitte:

1. Etablierung FOLFIRI-resistenter KRK-Zelllinien und Nachweis biologischer Effekte in der Zellkultur
2. Identifizierung zelllinienübergreifender, mit resistenz-assoziierten Genen mittels RNA-Sequenzierung
3. Validierung und Vergleich der Gensignatur mit klinischen Daten.

6.1 Verwendete Tumorzelllinien als Modellsystem für das mKRK

Es wurden die drei etablierten Zelllinien Colo205, HT29 und SW480 verwendet, die hinsichtlich des Mutationsstatus vergleichbar sind: Sie weisen alle eine Mikrosatellitenstabilität (MSS), eine APC- sowie eine TP53 Mutation auf. Der KRAS-RAF-ERK (MAPK) Kinase-Signalweg ist bei SW480 durch die KRAS Mutation p.Gly12Val und in Colo205 und HT29 durch die BRAF-Mutation p.Val600Glu dysreguliert. Die drei Zelllinien repräsentieren die Stadien Dukes B (SW480), Dukes C (HT29) und Dukes D (Colo205). Aus den Zelllinien wurden durch kontinuierliche Behandlung mit steigenden FOLFIRI-Konzentrationen drei FOLFIRI-resistente Subzelllinien hergestellt. Die Resistenzentwicklung ist mit regelmäßigen IC₅₀-Bestimmungen überprüft und validiert worden. Zusätzlich zur IC₅₀ Testung wurde die FOLFIRI-Resistenz mittels Propidiumiodid (PI)-Apoptose Assay bestätigt.

Zu berücksichtigen ist, dass die Colo205 Zelllinie von einer Aszites-Metastase stammt und der Patient 4-6 Wochen vor Probenentnahme Chemotherapie mit 5-FU erhalten hat (Bairoch, 2018; Li et al., 2020). Durch diese Vorbehandlung hätten teilresistente parentale Colo205 und eine weniger stark ausgeprägte Resistenz erwartet werden können, aber das Gegenteil war der Fall: Die Resistenz in Colo205 zeigte sich am stärksten ausgeprägt (RI = 20,81) und es wurden im Vergleich die meisten DEGs gefunden. Mögliche Erklärungen hierfür sind einerseits der zeitliche Abstand zwischen letzter Chemotherapiegabe,

Probenentnahme und Etablierung der Zelllinie, sowie andererseits die Zugabe von Irinotecan bei Etablierung der Subzelllinie Colo205R.

6.2 Aktivierung resistenz-assoziiertes Gene in Colo205R, HT29R und SW480R

FOLFIRI ist eins der Fluoropyrimidin-basierten Kombinationsschemata, die für die Erstlinienchemotherapie für Patient*innen mit mKRK mit gutem Allgemeinzustand und hoher Motivation angewandt werden sollen. Als weitere Fluoropyrimidin-basierte Kombinationsregime kommen FOLFOX – Kombination mit Oxaliplatin – sowie FOLFOXIRI – Kombination mit Oxaliplatin und Irinotecan infrage (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)).

Bisher existieren keine konkreten molekularpathologischen Kriterien, welches der genannten Schemata ausgewählt werden soll. Mit der Identifizierung neuer Biomarker könnte eine verbesserte Entscheidungsempfehlung für die Erstlinientherapie des mKRK gegeben werden und die prognostische Einstufung des Tumors verbessert werden.

Um sicherzustellen, dass die Etablierung der resistenten Subzelllinien gelungen ist und zur Validierung eines biologischen Effekts der etablierten FOLFIRI-Resistenz, wurde eine Vortestung durch RT-qPCR durchgeführt. Hierfür wurden die drei Gene *ECAD*, *VIM* und *TYMS* ausgewählt, da von diesen bekannt ist, dass sie bei Tumorprogression-, Invasion und Resistenzentwicklung bei mKRK eine wichtige Rolle spielen (Copur et al., 1995; Dudas et al., 2020).

ECAD und *VIM* sind Gene, welche an der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt sind. Hierbei werden Gene, die für die Ausbildung eines epithelialen Phänotyps verantwortlich sind, wie *ECAD*, herunterreguliert und stattdessen die Expression für jene Genprodukte aktiviert, die die Zelle einen mesenchymalen Phänotyp annehmen lassen, wie unter anderem Vimentin (Vu & Datta, 2017).

Während der EMT gewinnen transformierte epitheliale Zellen Eigenschaften, die Invasion und Metastasierung ermöglichen. Dieser Vorgang ist bei KRK ein wichtiger Faktor für Tumorprogression und Fernmetastasierung (Vu & Datta, 2017)

Die Thymidylatsynthase (*TYMS*) ist ein wichtiger Angriffspunkt für 5-FU. Vorangegangene Studien haben in 5-FU resistenten Zelllinien eine signifikante Amplifikation des *TYMS*-Gens und eine Überexpression des *TYMS*-Proteins nachgewiesen (Copur et al., 1995; Shibata et al., 1998). Diese erhöhte Expression korreliert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Resistenz gegen 5-FU (Blondy et al., 2020; Sobrero et al., 1990). Darüber hinaus konnte ein

schlechteres Gesamtüberleben bei hoher TS-Expression nach 5-FU-haltiger Chemotherapie nachgewiesen werden (Kamoshida et al., 2004).

Zusammenfassend sieht man an der Genexpression gezeigt in Abbildung 12, dass sich die Zelllinien Colo205 und HT29 hinsichtlich der Veränderung der Genexpression gleichen: Bei beiden Zelllinien zeigte sich die Herunterregulation von *ECAD* und die Hochregulation von *VIM* und *TYMS*, während *TYMS* und *ECAD* bei der Resistenzentwicklung von SW480 gegensätzlich reguliert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass Colo205 und HT29 besser miteinander vergleichbar sind.

Eine signifikante Hochregulation des Vimentingens konnte allerdings in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. Zugleich verringerte sich die *ECAD*-Expression in HT29 und in Colo205. Dazu passend änderte sich die Zellmorphologie der Colo205 von einem epithelialen Phänotyp zu einem mesenchymalen Phänotyp. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der epithelial-mesenchymalen Transitionsprozesses (EMT) in allen drei Zelllinien aktiviert wurde. Die verminderte *ECAD*-Expression weist zudem auf den Verlust der Adhärenskontakte in Colo205R hin (Hanahan & Weinberg, 2011).

Bei SW480 ist zusätzlich zu *VIM* auch *ECAD* hochreguliert. Da der Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Markern schrittweise über Zwischenzustände erfolgt, spricht dieses Ergebnis für partielle EMT (pEMT). Unter anderem Pastushenko et al. (2018) wiesen nach, dass diese Zwischen-Populationen unterschiedliche zelluläre Genexpressionssignaturen aufweisen und die pEMT-Tumorzellen beispielsweise schneller darin waren in den Blutkreislauf zu gelangen oder Metastasen zu bilden.

Die Zelllinie SW480 ist mit den Zelllinien Colo205 und HT29 auch deshalb wenig vergleichbar, da sie sich aus zwei verschiedenen Zelltypen, dem E-Typ (epithelial/polygonaler Phänotyp) und R-Typ (runder Phänotyp), welche unterschiedliche Eigenschaften besitzen, bildet: Tomita et al. (1992), Yoon et al. (2008) und Palmieri et al. (2014), (2015) verglichen die Subpopulationen hinsichtlich Morphologie und strukturellem Aufbau, Wachstumseigenschaften sowie Tumorigenität. Die Literatur hierzu ist uneins, welche der Subpopulationen die aggressivere Variante ist:

Bei der Untersuchung von Yoon et al. (2008) zeichneten sich die SW480 E-Typ Zellen durch ein invasiveres Wachstum sowie ein höheres Metastasierungspotential aus. Im Gegensatz dazu bildeten R-Typ SW480 Zellen große, nicht invasiv wachsende Primärtumore ohne Lymphknotenmetastasen. Palmieri et al. (2015) und Tomita et al. (1992) charakterisieren im

Gegensatz dazu den R-Typ im Besonderen durch Wachstum in Clustern, eine kürzere Verdopplungszeit, Verlust der Kontakthemmung, eine geringere Adhäsivität an Kulturplatten, Wachstum unabhängig von Verankerung an der extrazellulären Matrix und durch einen aneuploideren Karyotyp. Darüber hinaus zeigten Tomita et al. (1992) bei Nacktmäusen, dass R-Typ-Zellen im Vergleich größere und weniger differenzierte Tumore bilden, was darauf hindeutete, dass diese Subpopulation durch genetische Mutationen die malignere Variante darstellt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Tomita et al. (1992) und Palmieri et al. (2015) zeigten sich die SW480R Zellen dem R-Typ entsprechend in Clustern, wenig adhäsiv an der Kulturplatte wachsend.

Zusammen mit der erworbenen FOLFIRI-Resistenz sprechen auch die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass der R-Typ der maligneren Variante entspricht.

6.3 Identifizierung resistenz-assoziiertes Gene: Zelluläre FOLFIRI-12-Gen-Signatur

Der Großteil der zuvor durchgeführten Studien zu den molekularen Mechanismen der Chemotherapieresistenz bei KRK fokussiert sich auf die Einzelsubstanzen 5-FU, Irinotecan oder Oxaliplatin (Blondy et al., 2020; Xin-Xiang Li et al., 2014; Zheng et al., 2015) sowie den Einfluss spezifischer Faktoren wie z.B. Signalwege, Gene oder miRNAs auf die Resistenzentwicklung (Kukcinaviciute et al., 2018; Kumbrink et al., 2021; Pouya et al., 2022).

Alterationen in der Genexpression sowie *de novo* Null-Mutationen, die zur Therapieresistenz beitragen, sind bei einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem bei kolorektalen Karzinomen, neuroendokrinen Tumoren, Gliomen, Osteosarkomen und Melanomen bekannt (Valenzuela et al., 2021; Watson et al., 2015).

Um im Rahmen der Resistenzentwicklung neu aufgetretene Mutationen auf DNA-Ebene zu detektieren, wurde die DNA der Zelllinien sowie ihrer resistenten Äquivalente mittels Next Generation Sequencing (NGS, 161 Krebs-assoziierte Gene) sequenziert. Hierbei wurde die Missense-Mutation c.512G>T (p.Cys171Phe) im *ATRX*-Gen als einzige Neumutation in HT29 gefunden. Diese Variante ist in den Clinvar- (Landrum et al., 2018) und COSMIC (Tate et al., 2019) -Datenbanken bisher nicht beschrieben. Das Gesamturteil auf VarSome (Kopanios Christos et al., 2019) ist basierend auf Prädiktionsalgorithmen „wahrscheinlich pathogen“ (likely pathogenic).

Bisher ist das ATRX-Protein als wichtig für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und als Tumorsuppressor beschrieben (Valenzuela et al., 2021; Watson et al., 2015).

Für die Diagnostik von Tumoren des zentralen Nervensystems ist der *ATRX* Genstatus ein wichtiger molekularer Marker. Bei *ATRX*-Positivität muss eine 1p/19q-Kodeletionsanalyse zusätzlich durchgeführt werden, um zwischen einem IDH-mutierten Astrozytom und einem IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliom differenzieren zu können. Bei IDH-Mutation und *ATRX*-Verlust kann die Diagnose eines IDH-mutierten Astrozytom ohne 1p/19q-Kodeletionsanalyse gestellt werden (Wick, 2021).

Beim KRK ist nur wenig zur Rolle von *ATRX*-Mutationen bekannt, sodass sich aktuell der Beitrag zur Resistenzentwicklung der *ATRX*-Mutation bei HT29 nicht abschließend beurteilen lässt und weitere Forschung erforderlich macht.

Ein weiterer Ansatz, um resistenz-assoziierte Biomarker zu identifizieren ist die Analyse der Transkriptomebene. Ein Expressionsprofil, welches Ansprechen auf das Kombinationsschema FOLFIRI vorhersagt und molekulare Mechanismen aufzudecken versucht, wurde bisher einzig von Del Rio et al. (2007) anhand von Tumorproben von 21 Patienten beschrieben.

Hier wurden Tumorproben von 21 verschiedenen Patienten verwendet und das Ansprechen mittels klinischer Kriterien bewertet.

Eine Ergänzung soll diese Arbeit bieten. Hier wurde, nachdem FOLFIRI-Resistenz auf Zellkulturebene etabliert werden konnte, mittels RNA-Sequenzierung die Transkriptomsignatur der parentalen Zelllinien mit den resistenten Zelllinien verglichen.

Die Berechnung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene erfolgte mit der Analysesoftware Limma-voom. Costa-Silva et al. (2017) verglichen die Performance verschiedener DEG Softwarepakete: Hierbei hat sich Limma-voom in Bezug auf Präzision, Genauigkeit und Sensitivität als sehr zuverlässig erwiesen. Soneson and Delorenzi (2013) stellten Limma-voom als beste Methode für größere Stichprobengrößen heraus und konnten zusätzlich zeigen, dass die Methode auch für kleine Stichprobengrößen (zwei Proben pro Bedingung) verlässliche Ergebnisse liefert, welche im Vergleich zu anderen Methoden weniger abhängig vom Probenumfang sind. Da hier eine Stichprobengröße von zwei bis vier pro Bedingung vorliegt, wurde Limma-voom als geeignetste Methode ausgewählt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung gemeinsamer Resistenzmechanismen über den Vergleich gemeinsamer DEGs. Als Auswahlkriterien für differentiell exprimierte Gene galt eine \log_2 -fold change $|\geq 1|$ und ein korrigierter p -Wert von < 0.05 . Für Colo205

ergaben sich 222 DEGS, für HT29 47 DEGs und für SW480 30 DEGs. Für die Bestimmung gemeinsamer Resistenzmechanismen, wurde die Gesamtzahl der DEGs auf die Gene eingegrenzt, die zwischen ≥ 2 Zelllinien übereinstimmten. Hieraus ergab sich eine Gensignatur von 12 Genen.

Die Analyse der molekularen Funktion der 12 Gene ergab, dass es sich um Gene für Proteine des Zellaufbaus (*CAV2*, *PERP*) und des Zytoskeletts (*KRT17*, *GSN*), einen Oberflächenrezeptor (*TACSTD2*), Zelladhäsionsproteine (*CEACAM6*, *CAV2*), ein Transportprotein (*FXVD3*), ein Komplementbestandteil (*CD55*), ein Zytokin (*CCL5*) und zytoplasmatische Proteine (*MMP7*, *S100A4*, *ANXA13*) handelt.

Viele der Gene, insbesondere *CD55*, *MMP7*, *PERP*, *S100A4* und *KRT17* wurden in früheren Studien bereits mit verschiedenen Resistenzmechanismen wie unter anderem EMT und Veränderung der Zelladhäsion bei mKRK in Verbindung gebracht (Ametller et al., 2011; Fei et al., 2017; Hörndler et al., 2011; Hosch et al., 2001; Li et al., 2019; Roberts & Paraoan, 2020). Dies bestätigt die Relevanz der gefundenen Gene für die Resistenzentwicklung. Allerdings waren die Ergebnisse der zusätzlich durchgeführten funktionellen Genset-Anreicherungsanalyse (GSEA) zu unsicher, um die Rolle der Gensets in der FOLFIRI-Resistenz weiter zu diskutieren.

6.4 Untersuchung der Relevanz der zellulären Gensignatur in klinischen Datensätzen

Zum Abgleich der identifizierten DEG mit klinischen Daten wurde nach Expressionsdatensätzen von Patienten gesucht, die FOLFIRI als Erstlinienchemotherapie erhalten haben und deren Ansprechen evaluiert wurde. Es wurde die Studie von Del Rio et al. (2007) mit dem Datensatz GSE62322 von der GEO-Datenbank ausgewählt. Diese ist bisher die einzige klinische Studie, die auf Basis von Expressionsmustern von Tumorproben eine Gensignatur abgeleitet hat, welche das Ansprechen von Patienten auf FOLFIRI vorhersagen soll. Der Expressionsdatensatz ist vergleichsweise klein (21 Tumorproben), stimmt jedoch hinsichtlich der Fragestellung am besten mit dem hier verwendeten zellkulturbasierten Ansatz überein. Von den insgesamt 284 DEGs der Zelllinien waren im klinischen Datensatz nur 98 exprimiert, sodass letztlich von der 12-Gen-Signatur Expressionsdaten von nur drei Genen (*GSN*, *TACSTD2* und *PERP*) vorlagen. Allerdings konnte keine signifikant unterschiedliche Expression dieser drei Gene im GSE62322 Set bestimmt werden. Dieses Ergebnis ist besonders für *GSN* unerwartet, da dieses Gen in allen drei resistenten Zelllinien als signifikant hochreguliert (4.4-9.3-fach, $p < 0.0001$) gemessen wurde.

Um aus den 98 übereinstimmenden Genen die Gene zu identifizieren, die sowohl im Zellkulturmodell als auch in Tumorproben von Patienten signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$, $\log_{2}FC \geq 1$) exprimiert sind, wurde das „Limma Voom“ Paket sowohl auf der Galaxy- als auch zur Validierung auf der MR4Cancer Plattform mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Hieraus ergaben sich die Gene *SERPINE2* ($p_{\text{Galaxy}} = 0.03$, $\log_{2}FC_{\text{Galaxy}} = -1.14$), das auch zur 14-Gen-Signatur von Del Rio et al. (2007) gehört, und *TNC* ($p_{\text{Galaxy}} = 0.01$, $\log_{2}FC_{\text{Galaxy}} = -1.61$). Um diese Gene wurde die o.g. 12-Gen-Signatur erweitert.

Nach p -Korrektur zeigten sich *SERPINE2* und *TNC* nicht signifikant (Tabelle 21). Als Ursache ist die geringe Anzahl (98 Gene) der sich überschneidenden Genen wahrscheinlich, die sich aufgrund der geringen Probenanzahl im Zellkulturmodell (17 Proben, 2 biologische Replikate) als auch in der Studie ergaben. Unter anderem Stretch et al. (2013) zeigten bereits, dass sich die Genauigkeit von Genexpressionsanalysen mit zunehmender Probenanzahl verbessert.

Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Zelllinien ein Modellsystem für das mKRK des Patienten darstellen. Li et al. (2008), die Gliomzelllinien mit Gliom-Primärtumoren verglichen, stellten erhebliche Unterschiede auf genomischer, transkriptomischer und funktioneller Ebene fest. Es muss demzufolge beachtet werden, dass bei Verwendung von *in vitro* kultivierten Tumorzellen als Repräsentation von Patienten-Tumorproben die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf Karzinome *in vivo* übertragen werden können.

Trotzdem ist die Verwendung des Modellsystems „Zellkultur“ für Grundlagenforschung ein relevanter Bestandteil (Segeritz & Vallier, 2017).

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass ausgehend von der 14-Gen-Signatur weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Zelllinien und Replikaten sowie klinische Studien mit mehr Patienten erforderlich sind, um die Expressionsdaten zu erweitern und zu validieren.

6.5 Kürzeres Gesamtüberleben bei Überexpression von *TACSTD2*, *PERP*, *CAV2*, *SERPINE2* und *TNC*

Um die Bedeutung der einzelnen Gene der 14-Gen-Signatur für das Überleben von mKRK-Patienten zu untersuchen, wurde eine Überlebenszeitanalyse mit den Daten des Kolorektalkarzinom- (COAD) Datenset des Krebsgenom-Atlas (TCGA) durchgeführt.

Der Krebsgenom-Atlas (TCGA) – integriert in die Genomic Data Commons (GDC) – ist ein Forschungsprojekt zur molekularen Charakterisierung von Krebserkrankungen. Es ist in 70 Projekte (Version 32.0) untergliedert, welche eine gewisse Anzahl von Patientenfällen mit

u.a. Sequenzierungsdaten, Transkriptom-Profilen, Einzelnukleotidvariationen, Kopienanzahlvariationen, Methylierungsinformationen, klinischen Daten und ergänzenden Informationen zu den jeweiligen Proben enthalten (Grossman et al., 2016).

Das COAD-Datenset beinhaltet insgesamt 594 Tumorproben. Anatomisch sind 436 Proben dem Kolon und 152 dem Rektum zuordenbar. Die 6 Proben, über die sich keine Angabe machen ließ, wurden bei der folgenden Analyse ausgeschlossen. Von den 588 Patienten litten 85 Patient*innen an einem mKRK, dem Stadium IV nach UICC entsprechend. Nur zwei Patient*innen mit Stadium IIIC Erkrankung bzw. Stadium IV Erkrankung, erhielten das Kombinationsschema FOLFIRI.

Hieraus zeigt sich, dass der verwendete Datensatz und die Überlebenszeitanalyse nicht uneingeschränkt auf die Ergebnisse der FOLFIRI-14-Gen-Resistenzsignatur übertragen werden kann. Trotzdem bietet sie einen wichtigen Anhalt für die prognostische Relevanz der einzelnen Gene für das Gesamtüberleben von Patienten.

Als prognostisch mit reduziertem Gesamtüberleben (overall survival, OS) assoziiert, zeigte sich die Überexpression von *TACSTD2*, *PERP*, *CAV2*, *SERPINE2* und *TNC*. Entgegen der Assoziation der Herunterregulierung der *SERPINE2*- und *TNC*-Expression in den Nicht-Ansprechern (NR) des GSE62322-Datensatzes unterstützen die TCGA COAD Überlebensdaten eher die in den resistenten Zelllinien beobachtete erhöhte Expression dieser beiden Gene.

Damit stellen *TACSTD2*, *PERP*, *CAV2*, *SERPINE2* und *TNC* eine potentielle Resistenzsignatur oder auch prognostische Einzel-Marker dar.

Im Folgenden soll auf die jeweilige Funktion, die Rolle bei Tumorerkrankungen, insbesondere bei KRK, die Bedeutung für Chemotherapieresistenz und auf die Anwendung in der Klinik z.B. als therapeutisches Ziel oder Prognosefaktor der fünf Gene eingegangen werden.

Von *TACSTD2* wird das transmembrane Glykoprotein Trop-2 (Trophoblast cell surface antigen 2) kodiert. In allen drei Zelllinien konnte bei Resistenzentwicklung eine signifikante Dysregulation nachgewiesen werden: Eine Überexpression in Colo205R (logFC: 1.62, p_{adj} = 0.0147) und SW480R (logFC: 2.70, p_{adj} = 0.0284), in HT29R war eine signifikante Herunterregulierung (logFC: -1.86, p_{adj} = 0.0351) nachweisbar. Die Analyse der mRNA-

Expressionsdaten des klinischen Datensatzes (GSE62322) ergab kein signifikantes Ergebnis (\log_{FC} : -0.46, p = 0.11, p_{adj} = 0.67). Prognostisch zeigte die Überlebenszeitanalyse die Überexpression von *TACSTD2* mit reduziertem Gesamtüberleben assoziiert (p = 0.015). Trop-2, ein Zelloberflächenrezeptor, der Kalziumsignale weiterleitet, wird in vielen Tumorentitäten überexprimiert – seine Überexpression korreliert bei KRK mit verringerter Überlebensrate, erhöhter Tumoraggressivität und Metastasierung (Guerra et al., 2021; Ohmachi et al., 2006).

Als Mechanismus beschreiben Guerra et al. (2021) die Interaktion von *TACSTD2* mit der Metalloprotease ADAM10: Nach Anregung von ADAM10 durch *TACSTD2* spaltet ADAM10 die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin ab, was zur Ablösung von E-Cadherin von β -Actin führt. Die Zell-Zell-Adhäsion geht hierdurch verloren, was infolgedessen zur Dysregulation des β -Catenin Signalwegs und zur Invasionsfähigkeit führt.

Weiterhin ist Trop-2 auch an der Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs beteiligt, was ebenfalls zu Zelltod-Resistenz, Zellproliferation, Migration, Invasion beiträgt und dem Überleben von Krebszellen führt (Shvartsur & Bonavida, 2015).

Eine Antikörper-basierte Therapie gegen Trop-2 mit Sacituzumab Govitecan (SG) ist seit 11/2021 in Deutschland „als Monotherapie zur Behandlung von erwachsenen PatientInnen mit nicht resezierbarem oder metastasiertem triple-negativem Mammakarzinom [...] [zugelassen], die zuvor zwei oder mehr systemische Therapien erhalten haben, darunter mindestens eine gegen die fortgeschrittene Erkrankung“ (European Medicines Agency, 2021). Basierend auf der Phase 2-Studie TROPHY wurde SG von der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA bereits im April 2021 die Behandlung von lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom als Zweit- bzw. Drittlinientherapie für Patient*innen zugelassen, die zuvor bereits mit einer platinhaltigen Chemotherapie und entweder einem Programmed Death Rezeptor-1- oder einem Programmed Death-Ligand 1-Inhibitor behandelt wurden (Koli, 2021; Tagawa et al., 2021).

Sacituzumab Govitecan (SG) ist ein Antikörper-Medikament-Konjugat (antibody-drug conjugate, ADC) bestehend aus einem monoklonalen Antikörper (hRS7 IgG1 κ) gegen Trop-2, der über einen hydrolysierbaren Linker mit SN-38, dem aktiven Metaboliten von Irinotecan, gekoppelt ist. An jedes Antikörpermolekül sind bis zu 8 SN-38 Moleküle kovalent gebunden (Bardia, Hurvitz, et al., 2021; Bardia, Messersmith, et al., 2021).

Bei hoher Trop-2 Konzentration, die unter anderem bei Brustkrebs vorliegt (Carey et al., 2022), bindet das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat an dem Zelloberflächenrezeptor Trop-2.

Der Wirkstoff SN-38 kann anschließend durch Endozytose in die Tumorzelle gelangen und diese abtöten (*Triple-negativer Brustkrebs: Überlebensvorteil mit Sacituzumab Govitecan*, 2022).

In der Phase I/II IMMU-132-01 Studie wurden die Effektivität von SG bei epithelialen Tumoren untersucht: In der Studie waren 31 Patienten mit KRK eingeschlossen, von denen die Mehrheit (29/31 Patienten) im Vorhinein mit Irinotecan behandelt wurde. Die Ansprechrate (Objective response rate, ORR) betrug 3.2% (95%KI: 0.1- 16.7). Generell war bei gastrointestinalen Tumoren (KRK, Ösophaguskarzinom, Pancreaskarzinom) geringes bis kein Ansprechen zu beobachten (Bardia, Messersmith, et al., 2021). Die geringe Ansprechrate bei KRK auf das anti-Trop2-Irinotecan-Konjugat ist möglicherweise durch die Vorbehandlung mit Irinotecan und eine dadurch entstandene Resistenz zu erklären.

Voraussetzung für die Wirksamkeit von SG ist die hohe Proteinexpression von Trop-2. Dum et al. (2022) zeigten in 32.5% der unbehandelten Adenokarzinome des Kolons eine schwache, in 10.9% eine moderate und in nur 4.2% eine hohe Expression nach Trop-2-Immunfärbung. Die resistenten Zelllinien zeigten im Vergleich zu unbehandelten parentalen Zelllinien eine Überexpression in zwei von drei Zelllinien. Daraus kann zum einen vermutet werden, dass Trop-2 durch Chemotherapie-Applikation, hier FOLFIRI, induziert werden kann, wie es bereits für die Thymidylat-Synthase (*TYMS*) durch 5-FU beschrieben wurde (Varghese et al., 2019). Zum anderen könnte SG bei mKRK in der Primärsituation eine Therapieoption darstellen und in der FOLFIRI-Resistenz ein anderes an den Trop-2-Antikörper konjugiertes Chemotherapeutikum verwendet werden (Marhold, 2022). Allerdings wäre vor Anwendung eine Bestimmung der Trop-2-Expression z.B. über eine Immunhistochemische-Färbung (IHC) zwingend erforderlich.

Für das Tetraspan-Plasmamembranprotein *PERP* konnte in den Zelllinien Colo205R (logFC: 1.27, $p_{adj} = 9.23 \times 10^{-4}$) und HT29R (logFC: 1.51, $p_{adj} = 1.11 \times 10^{-3}$) eine signifikant höhere mRNA-Konzentration nachgewiesen werden. Korrelierend dazu zeigte sich in der KM-Überlebenszeitanalyse der TCGA-Daten bei Überexpression ein signifikant reduziertes OS ($p = 0.044$). Im Gegensatz dazu ergaben die klinischen Expressionsdaten (GSE62322) kein signifikantes Ergebnis.

PERP ist sowohl an dem embryonalen Entwicklungsprogramm *in vivo* als auch an der desmosomalen Zell-Zelladhäsion beteiligt sowie ein wichtiges, an der Apoptose beteiligtes Zielgen des Tumorsuppressors p53 (Attardi et al., 2000; Beaudry et al., 2010; Ihrle et al., 2005; Ihrle et al., 2003).

Unter anderem Khan et al. (2016), Kong et al. (2013) und Zhai et al. (2019) zeigten bei verschiedenen Tumorentitäten die Herunterregulation von *PERP* während der Tumorgenese und –progression. Roberts and Paraoan (2020) schreiben *PERP* in ihrem Review eine komplexe Rolle bei Tumoren zu, die bisher nicht im Detail aufgeklärt wurde. Sie beschreiben *PERP* vorrangig als Tumorsuppressor und p53-abhängigen Apoptose-Vermittler. Weiterhin scheint *PERP* an der Zell-Zell-Adhäsion sowie an Mechanismen der EMT beteiligt zu sein (Roberts & Paraoan, 2020).

Zusammenfassend bleibt die Bedeutung der Überexpression für Chemotherapieresistenz und für die klinische Anwendung unklar – die Zelllinien- und TCGA-Daten sprechen für tumortreibend, die bisherigen Studien sprechen dagegen. Da die *PERP*-Expression vor allem von p53 abhängt (McDonnell et al., 2019), kann vermutet werden, dass eine p53-Mutation den *PERP*-p53-Crosstalk beeinflusst und somit auch die Rolle von *PERP* bei Resistenzentstehung.

Ein weiteres Gen, welches in zumindest zwei resistenten Zelllinien als signifikant (Colo205R: logFC: 2.82, $p_{adj} = 0.0145$, HT29R: logFC: 2.73, $p_{adj} = 3.26 \times 10^{-3}$) überexprimiert gefunden wurde, ist *CAV2*. Auch in der in der KM-Überlebenszeitanalyse der TCGA-Daten wurde bei Überexpression ein signifikant reduziertes OS ($p = 0.022$) gefunden. Im GSE62322-Datensatz ist das Gen nicht gelistet.

CAV2 ist ein Transmembranprotein und gehört zur Familie der Caveoline (*CAV1*, *CAV2*, *CAV3*), welche die funktionell wichtigsten Proteine für die caveolare Organisation sind (Raja et al., 2019). Caveolae fungieren unter anderem über Membranrezeptoren, Molekültransport, Proteinkinasen und Signalmoleküle als signalübertragende Plattform für die zelluläre Koordination und Interaktion. Insbesondere Tumorerkrankungen, aber auch andere Pathologien können durch eine fehlerhafte Signalübertragung verursacht werden. *CAV1* und *CAV2* weisen ähnliche Gewebe-spezifische Expressionsmuster auf, da *CAV2* und *CAV1* zur Stabilisierung benötigt werden, während *CAV3* spezifisch für Muskelgewebe ist (Martinez-Outschoorn et al., 2015).

Lavie et al. (1998) untersuchten die Rolle der Caveoline bei MDR-Zellen (multiple Drug Resistance, MDR). Sie verwendeten HT29-/HT29-MDR Zellen sowie MCF-7/MCF-7-MDR Mamma-Adenokarzinom Zellen und konnten eine Hochregulierung von *CAV1*, *CAV2* und Glucosylceramid in den MDR-Zellen nachweisen. Die zusätzlich durchgeführte Elektronenmikroskopie des Plasmalemm von HT29- und MCF-7-MDR Zellen zeigte eine Vielzahl vesikulärer Strukturen (Caveolae), durch die Pharmaka ausgeschleust werden können, während die jeweils korrespondierenden Wildtyp-Zellen signifikant weniger

aufwiesen. Diese biochemischen und morphologischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Caveolae für die MDR-Entwicklung relevant sind.

Zhou et al. (2022) publizierten auf Grundlage von Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten (scRNA-seq-Daten) eine 7-Gen-Signatur, welche ebenfalls *CAV2* enthält. Sie verwendeten Sequenzierungsdaten vor und nach 5-FU-Behandlung aus der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank und erforschten so, auf Einzelzell-Ebene, die durch 5-FU veränderte Transkriptionsregulation. Mit dieser Gensignatur soll die Prognose von KRK-Patient*innen unter verschiedenen klinischen Bedingungen vorhergesagt werden können. Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate der hier untersuchten Zelllinien, dass *CAV2* eine relevante Rolle bei mKRK und Chemotherapie-Resistenz innehat.

In zwei der resistenten Zelllinien (Colo205R, $p_{adj} = 1.38 \times 10^{-5}$, und SW480R, $p = 0.044$, $p_{adj} = 1.0$) konnte eine signifikant erhöhte *SERPINE2*-Expression nachgewiesen werden, während in HT29R ($p = 0.0035$) und in den GSE62322 Daten ($p = 0.026$) eine signifikante Reduktion beobachtet wurde. Eine Überlebenszeit-Analyse der TCGA-Daten zeigte, dass die Überexpression von *SERPINE2* prognostisch mit reduziertem OS assoziiert ist ($p = 0.027$). Dass *SERPINE2* onkogenes Potential besitzt, konnte in früheren Studien ebenfalls nachgewiesen werden:

Selzer-Plon et al. (2009) zeigten an 116 Gewebeproben, dass bei Kolorektalkarzinomen mit zunehmenden Tumorgrad erhöhte mRNA- und Proteinkonzentrationen von *SERPINE2* vorliegen. Bei Pankreas-, Brust und Bronchialkarzinomen konnte zudem gezeigt werden, dass *SERPINE2* das invasive Wachstum verstärkt (Buchholz et al., 2003; Candia et al., 2006; Yang et al., 2009). Bei KRK lassen die Ergebnisse von Bergeron et al. (2010) darauf schließen, dass die Expression von *SERPINE2* von der MEK/ERK Aktivität abhängig ist und sie bei onkogener Aktivierung von Ras, BRAF und MEK1 hochreguliert wird. Im Zellkulturmodell konnten sie bei *SERPINE2* Inaktivierung durch Silencing eine deutliche Verringerung des MEK-induzierten Wachstums und der MEK-induzierten Migration nachweisen. Im nächsten Schritt wurde tierexperimentell bestätigt, dass die Tumorgenität von KRK-Zelllinien durch Herunterregulation von *SERPINE2* verringert wird.

Zusammenfassend sprechen die Daten der Zelllinien und der TCGA-Kohorte sowie die vorhandenen Studien dafür, dass eine *SERPINE2*-Überexpression Tumor- und Resistenz-treibend ist. Im Gegensatz dazu ergab die differentielle Expressionsanalyse des GSE62322 Datensatzes eine signifikante *SERPINE2*-Herunterregulation in der Nicht-Ansprecher-Kohorte. Dadurch, dass der GSE- Datensatz nur 21 Tumorproben beinhaltet, ist die Relevanz dieses gegensätzliche Ergebnis zweifelhaft und sollte nicht überbewertet werden.

Es ist jedoch weitere Forschung erforderlich, um die genaue Rolle von *SERPINE2* für Karzinogenese, invasives Wachstum und Resistenzentwicklung zu entschlüsseln.

Das fünfte Gen der hier identifizierten 5-Gen-FOLFIRI-Resistenzsignatur ist *TNC*. In den zwei der drei Zelllinien, Colo205R (logFC: 3.62, adj. $p = 0.04$) und SW480R (logFC: 4.77, $p = 0.0039$, adj. $p = 0.36$), wurde eine Überexpression nachgewiesen, welche in der KM-Überlebenszeitanalyse prognostisch mit kürzerem OS ($p = 0.034$) assoziiert war. Im Gegensatz dazu ergab die Expressionsanalyse des klinischen Datensatzes eine *TNC* Herunterregulation bei Nicht-Ansprechen.

TNC ist ein Extrazelluläre Matrix- (EZM) Glykoprotein, welches sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe exprimiert und von Tumor- und Bindegewebszellen sezerniert wird (Giblin & Midwood, 2015; Yang et al., 2018). Neben einer Rolle bei der Embryonalentwicklung findet sich eine vorübergehend erhöhte *TNC*-Expression in Geweben, wo erhöhter Zellumsatz, Plastizität und aktiver Gewebeumbau erforderlich sind z.B. im Zentralnervensystem (ZNS), in Stammzellnischen sowie bei der Wundheilung. Persistierende *TNC*-Expression wurde sowohl bei entzündlichen Erkrankungen u.a. bei Rheumatoider Arthritis, Myokarditis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen nachgewiesen (Giblin & Midwood, 2015). Bei Tumorerkrankungen ist *TNC*, als Teil des Stromas, relevant für Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung (Midwood & Orend, 2009). Die Übersichtsarbeit von Orend and Chiquet-Ehrismann (2006) stützt die Annahme, dass *TNC* die Tumorgenese fördert, indem es die Genomstabilität beeinträchtigt, die immunologische Antwort blockiert und somit Tumorzellen eine Nische zum Überleben und zur Ausbreitung bietet. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wiesen Zhou et al. (2019) und Yang et al. (2020) bei KRK eine erhöhte *TNC* Expression nach, verbunden mit einem deutlich schlechterem klinischen Outcome. Murakami et al. (2017) zeigten eine Korrelation von *TNC*-Expression im KRK-Stroma und dem synchronen Vorhandensein von Lebermetastasen und diskutierten *TNC* daher als potentiellen postoperativen Prognosemarker.

Auch bei Resistenz scheint die *TNC*-Expression eine Rolle zu spielen: Helleman et al. (2008) zeigten, dass bei Patient*innen mit metastasiertem Mammakarzinom mit hoher *TNC* Expression das Ansprechen auf Tamoxifen reduziert ist und die erhöhte Expression mit kürzerem PFS einhergeht. Shi et al. (2015) wiesen bei Pankreaskarzinom eine Apoptoseresistenz durch *TNC*-vermittelte Aktivierung der ERK1/2/NF- κ B/p65-

Signalkaskade nach. Sie schlagen *TNC* daher sowohl als diagnostischen Marker als auch als potentiell Zielgen für die zielgerichtete Tumorthherapie bei Pankreaskarzinom vor.

In der Zusammenschau lässt sich hieraus ableiten, dass *TNC* ein bekanntes und relevantes Onkogen ist. Die Zelllinien- und TCGA-Daten unterstützen die Hypothesen der Studien, dass seine Überexpression mit Tumorprogression, -invasion und Metastasierung assoziiert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es auch eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt – sowohl bei Pankreaskarzinom als auch bei mKRK: In dieser Arbeit konnte *TNC* in der Gensignatur für FOLFIRI-Resistenz bei KRK nachgewiesen werden. Die Bedeutung der *TNC*-Herunterregulation Expressionsanalyse des klinischen Datensatzes ist vor diesen Aspekten als strittig anzusehen.

Das klinische Expressionsdatenset (GSE62322, Del Rio et al. (2007)) kann insgesamt aufgrund der geringen Datenmenge (21 Tumorproben) als wenig repräsentativ angesehen werden. In den Studien mit einer größeren Anzahl von Patienten, wie z. B. der PETACC-3-Studie (Van Cutsem et al., 2009), in der die Auswirkung der Hinzunahme von Irinotecan zum 5-FU/Leucovorin (LV5FU2) -Schema auf das krankheitsfreie Überleben untersucht wurde, waren jedoch nur die Expressionsdaten, nicht aber die Ansprechdaten verfügbar.

In dieser Doktorarbeit konnte mittels RNA-Sequenzierung ein Muster der Genexpression identifiziert werden, welches die Prognose für Ansprechen auf FOLFIRI bei mKRK in Zukunft erleichtern soll. Da die Ergebnisse jedoch auf Zellkultur sowie bioinformatischer Analyse beruhen, ist es wichtig, diese Gene in der Zellkultur auf funktioneller Ebene mit beispielsweise Gen-Knock-Down zu validieren.

Weiterführend ist auch eine individuelle Risikovorhersage für FOLFIRI-Resistenz mit multivariater logistischer Regression denkbar. Hiermit können Koeffizienten für jedes Gen berechnet werden, welche mit den kontinuierlichen Expressionswerten für das entsprechende Gen multipliziert und anschließend addiert werden können. Mit Hilfe einer ROC-Analyse kann im nächsten Schritt festgestellt werden, wie gut das Vorhersagemodell für Patienten mit und ohne Überexpression der FOLFIRI-Resistenzsignatur ist.

In einem klinischen Ansatz sollte die 5-Gensignatur in einer größeren Patientenkohorte überprüft und gegebenenfalls erweitert werden, um sie letztendlich in die molekularpathologische Routinediagnostik einführen zu können.

Anhang

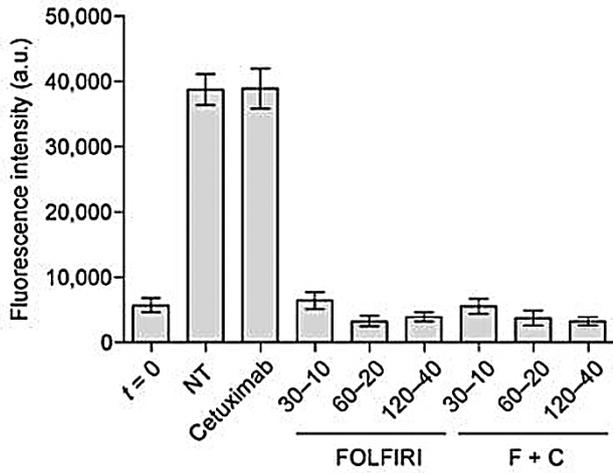
TNM-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa (intraperitoneale Anteile), Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes (sekundär retroperitoneale Anteile)
T4	Perforation des viszeralen Peritoneums (T4a) oder Infiltration anderer Organe/Strukturen (T4b)
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	1–3 regionäre Lymphknoten
N2a	4–6 regionäre Lymphknoten
N2b	≥7 regionäre Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen: Nur ein Organ betroffen
M1b	Fernmetastasen: Mehr als ein Organ betroffen
M1c	Fernmetastasen im Peritoneum, mit oder ohne Befall anderer Organe

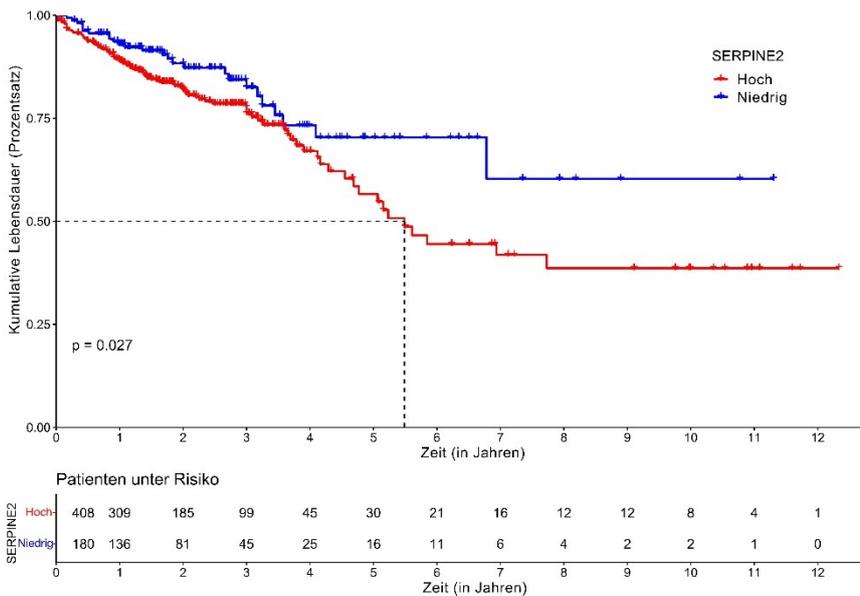
Supplementäre Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms;
Entnommen und adaptiert aus Wittekind (2017)

CAV1	logFC	<i>p</i>	<i>p-adj.</i>
Colo205	5.21	2.23x10 ⁻⁵	0.0023
HT29	1.60	0.02	1

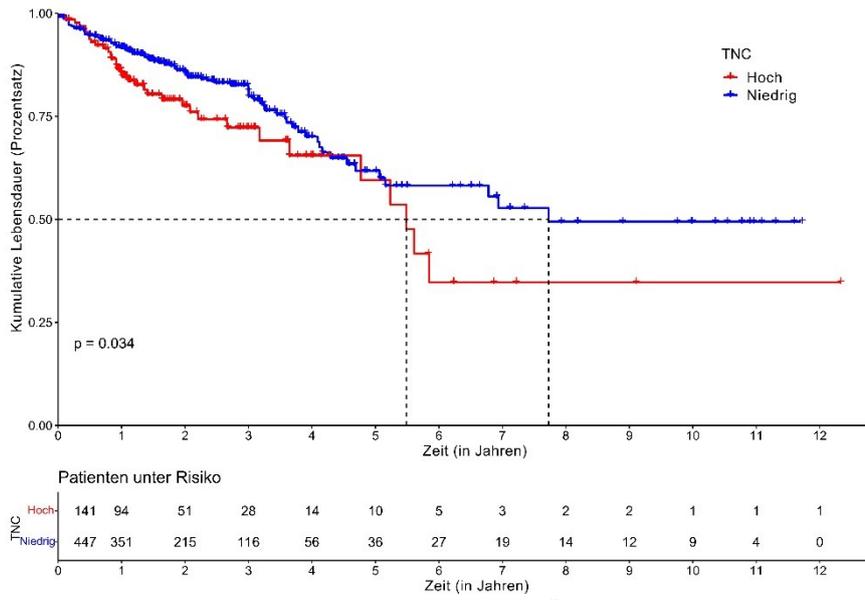
Supplementäre Tabelle 2: logFC und p-Wert für CAV1



Supplementäre Abbildung 1: Pozzi et al. (2016): Zellwachstum von hEGFR-CT26-Zellen gezeigt als Fluoreszenzintensität bei Behandlungsbeginn (t=0) und nach 72-stündiger Behandlung mit Cetuximab (C), FOLFIRI (F) in drei verschiedenen Konzentrationen (Irinotecan 30, 60 oder 120 μM + 5-FU-Calciumlevofolinat 10, 20 oder 40 μM) oder in Kombination mit Cetuximab (F + C).



Supplementäre Abbildung 2: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für SERPINE2 Expressionsdaten des COAD Datensets (TCGA-Datenbank über cBioPortal)



Supplementäre Abbildung 3: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für TNC Expressionsdaten des COAD Datensets (TCGA-Datenbank über cBioPortal)

Literaturverzeichnis

- Agendia. (2021). *Weiter auf dem richtigen Weg – genomische Informationen beim frühen Brustkrebs. MammaPrint etabliert sich als umfassender Präzisionstest in Deutschland*. Retrieved 11.04. from <https://www.mammaprint.de/weiter-auf-dem-richtigen-weg/>
- Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 18(1), 18-25. <https://doi.org/10.3747/co.v18i1.708>
- American Cancer Society. (2017). *Survival Rates for Colorectal Cancer*. American Cancer Society. Retrieved 12.04 from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
- Ametller, E., García-Recio, S., Pastor-Arroyo, E. M., Callejo, G., Carbó, N., Gascón, P., & Almendro, V. (2011). Differential regulation of MMP7 in colon cancer cells resistant and sensitive to oxaliplatin-induced cell death. *Cancer Biology & Therapy*, 11(1), 4-13. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.1.13672>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2014). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166-169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews, S. (n.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Retrieved 31.01.2022 from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), 25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W., & Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev*, 14(6), 704-718. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316461/pdf/x3.pdf>
- Bairoch, A. (2018). The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *Journal of Biomolecular Techniques*, 29(2), 25-38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>
- Balak, M. N., Gong, Y., Riely, G. J., Somwar, R., Li, A. R., Zakowski, M. F., Chiang, A., Yang, G., Ouerfelli, O., Kris, M. G., Ladanyi, M., Miller, V. A., & Pao, W. (2006). Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 12(21), 6494-6501. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1570>
- Bardia, A., Hurvitz, S. A., Tolaney, S. M., Loirat, D., Punie, K., Oliveira, M., Brufsky, A., Sardesai, S. D., Kalinsky, K., Zelnak, A. B., Weaver, R., Traina, T., Dalenc, F., Aftimos, P., Lynce, F., Diab, S., Cortés, J., O'Shaughnessy, J., Diéras, V., . . . Rugo, H. S. (2021). Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 384(16), 1529-1541. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028485>
- Bardia, A., Messersmith, W. A., Kio, E. A., Berlin, J. D., Vahdat, L., Masters, G. A., Moroosse, R., Santin, A. D., Kalinsky, K., Picozzi, V., O'Shaughnessy, J., Gray, J. E., Komiya, T., Lang, J. M., Chang, J. C., Starodub, A., Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M., Maliakal, P., . . . Ocean, A. J. (2021). Sacituzumab govitecan, a Trop-2-directed antibody-drug conjugate, for patients with epithelial cancer: final safety and efficacy results from the phase I/II IMMU-132-01 basket trial. *Annals of Oncology*, 32(6), 746-756. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.03.005>
- Beaudry, V. G., Jiang, D., Dusek, R. L., Park, E. J., Knezevich, S., Ridd, K., Vogel, H., Bastian, B. C., & Attardi, L. D. (2010). Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *Plos Genetics*, 6(10), e1001168. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001168>
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20(26), 3354-3362. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <http://www.jstor.org/stable/2346101>

- Bergeron, S., Lemieux, E., Durand, V., Cagnol, S., Carrier, J. C., Lussier, J. G., Boucher, M.-J., & Rivard, N. (2010). The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. *Molecular Cancer*, 9(1), 271. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-271>
- Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Science*, 111(9), 3142-3154. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>
- Buchholz, M., Biebl, A., Neesse, A., Wagner, M., Iwamura, T., Leder, G., Adler, G., & Gress, T. M. (2003). SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Research*, 63(16), 4945-4951.
- Candia, B. J., Hines, W. C., Heaphy, C. M., Griffith, J. K., & Orlando, R. A. (2006). Protease nexin-1 expression is altered in human breast cancer. *Cancer Cell International*, 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-6-16>
- Carey, L. A., Loirat, D., Punie, K., Bardia, A., Diéras, V., Dalenc, F., Diamond, J. R., Fontaine, C., Wang, G., Rugo, H. S., Hurvitz, S. A., Kalinsky, K., O'Shaughnessy, J., Loibl, S., Gianni, L., Piccart, M., Zhu, Y., Delaney, R., Phan, S., & Cortés, J. (2022). Sacituzumab govitecan as second-line treatment for metastatic triple-negative breast cancer-phase 3 ASCENT study subanalysis. *NPJ Breast Cancer*, 8(1), 72. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00439-5>
- Chen, Q., Gao, P., Song, Y., Huang, X., Xiao, Q., Chen, X., Lv, X., & Wang, Z. (2020). Predicting the effect of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy on colorectal cancer recurrence: A model using gene expression profiles. *Cancer Med*, 9(9), 3043-3056. <https://doi.org/10.1002/cam4.2952>
- Clough, E., & Barrett, T. (2016). The Gene Expression Omnibus Database. *Methods in Molecular Biology*, 1418, 93-110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5
- Colucci, G., Gebbia, V., Paoletti, G., Giuliani, F., Caruso, M., Gebbia, N., Carteni, G., Agostara, B., Pezzella, G., Manzione, L., Borsellino, N., Misino, A., Romito, S., Durini, E., Cordio, S., Di Seri, M., Lopez, M., Maiello, E., Montemurro, S., . . . Gruppo Oncologico Dell'Italia, M. (2005). Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *Journal of Clinical Oncology*, 23(22), 4866-4875. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.113>
- Copur, S., Aiba, K., Drake, J. C., Allegra, C. J., & Chu, E. (1995). Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1419-1426. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00067-a](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00067-a)
- Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PloS One*, 12(12), e0190152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*, 38(2), 179-193. <https://doi.org/10.1053/shem.2001.21929>
- De Mattia, E., Cecchin, E., & Toffoli, G. (2015). Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: Toward targeted personalized therapy. *Drug Resist Updat*, 20, 39-70. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.05.003>
- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilias, G., Kalogeras, K. T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., Penault-Llorca, F., Rougier, P., Vincenzi, B., Santini, D., Tonini, G., Cappuzzo, F., Frattini, M., Molinari, F., Saletti, P., . . . Tejpar, S. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncology*, 11(8), 753-762. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70130-3)
- Del Rio, M., Molina, F., Bascoul-Mollevi, C., Copois, V., Bibeau, F., Chalbos, P., Bareil, C., Kramar, A., Salvétat, N., Fraslou, C., Conseiller, E., Granci, V., Leblanc, B., Pau, B., Martineau, P., & Ychou, M. (2007). Gene Expression Signature in Advanced Colorectal Cancer Patients Select Drugs and Response for the Use of Leucovorin, Fluorouracil, and Irinotecan. *Journal of Clinical Oncology*, 25(7), 773-780. <https://doi.org/10.1200/jco.2006.07.4187>

- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dudas, J., Ladanyi, A., Ingruber, J., Steinbichler, T. B., & Riechelmann, H. (2020). Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020428>
- Dum, D., Taherpour, N., Menz, A., Höflmayer, D., Völkel, C., Hinsch, A., Gorbokon, N., Lennartz, M., Hube-Magg, C., Fraune, C., Bernreuther, C., Lebok, P., Clauditz, T. S., Jacobsen, F., Sauter, G., Uhlig, R., Wilczak, W., Steurer, S., Minner, S., . . . Luebke, A. M. (2022). Trophoblast Cell Surface Antigen 2 Expression in Human Tumors: A Tissue Microarray Study on 18,563 Tumors. *Pathobiology*. <https://doi.org/10.1159/000522206>
- European Medicines Agency, E. (2021). EMA/598134/2021 - EMEA/H/C/005182 - Trodelvy (sacituzumab govitecan) An overview of Trodelvy and why it is authorised in the EU. Retrieved 06.04.22 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/trodelvy-epar-medicine-overview_en.pdf
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trodelvy-epar-product-information_de.pdf
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrini, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., Cortesi, E., Picone, V., Vitello, S., Chiara, S., Granetto, C., Porcile, G., Fioretto, L., Orlandini, C., Andreuccetti, M., & Masi, G. (2007). Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of Clinical Oncology*, 25(13), 1670-1676. <https://doi.org/10.1200/jco.2006.09.0928>
- Fei, F., Qu, J., Zhang, M., Li, Y., & Zhang, S. (2017). S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget*, 8(42), 73219-73239. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18016>
- Feldt, J., Schicht, M., Garreis, F., Welss, J., Schneider, U. W., & Paulsen, F. (2019). Structure, regulation and related diseases of the actin-binding protein gelsolin. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 20, e7. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.7>
- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) User Guide. Broad Institute, Inc. Retrieved 05.07. from <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html>
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, 21(8), 938-945. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>
- Giblin, S. P., & Midwood, K. S. (2015). Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr*, 9(1-2), 48-82. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.987587>
- Girardot, C., Scholtalbers, J., Sauer, S., Su, S.-Y., & Furlong, E. E. M. (2016). Je, a versatile suite to handle multiplexed NGS libraries with unique molecular identifiers. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 419. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1284-2>
- Glas, A. M., Floore, A., Delahaye, L. J., Witteveen, A. T., Pover, R. C., Bakx, N., Lahti-Domenici, J. S., Bruinsma, T. J., Warmoes, M. O., Bernards, R., Wessels, L. F., & Van't Veer, L. J. (2006). Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*, 7, 278. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-278>
- Gmeiner, W. H. (2020). Fluoropyrimidine Modulation of the Anti-Tumor Immune Response- Prospects for Improved Colorectal Cancer Treatment. *Cancers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061641>
- Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C., & Alberts, S. R. (2004). A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(1), 23-30. <https://doi.org/10.1200/jco.2004.09.046>

- Grossman, R. L., Heath, A. P., Ferretti, V., Varmus, H. E., Lowy, D. R., Kibbe, W. A., & Staudt, L. M. (2016). Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *New England Journal of Medicine*, 375(12), 1109-1112. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1607591>
- Gruening, B. A. (2014). *Galaxy wrapper*.
- Guerra, E., Trerotola, M., Relli, V., Lattanzio, R., Tripaldi, R., Vacca, G., Ceci, M., Boujnah, K., Garbo, V., Moschella, A., Zappacosta, R., Simeone, P., de Lange, R., Weidle, U. H., Rotelli, M. T., Picciariello, A., Depalo, R., Querzoli, P., Pedriali, M., . . . Alberti, S. (2021). Trop-2 induces ADAM10-mediated cleavage of E-cadherin and drives EMT-less metastasis in colon cancer. *Neoplasia*, 23(9), 898-911. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.07.002>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, E. M. F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., . . . Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350-1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H. J., Tveit, K. M., & Gibson, F. (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.11.002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hata, A. N., Niederst, M. J., Archibald, H. L., Gomez-Caraballo, M., Siddiqui, F. M., Mulvey, H. E., Maruvka, Y. E., Ji, F., Bhang, H.-e. C., Krishnamurthy Radhakrishna, V., Siravegna, G., Hu, H., Raof, S., Lockerman, E., Kalsy, A., Lee, D., Keating, C. L., Ruddy, D. A., Damon, L. J., . . . Engelman, J. A. (2016). Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature Medicine*, 22(3), 262-269. <https://doi.org/10.1038/nm.4040>
- Heinemann, V., von Weikersthal, L. F., Decker, T., Kiani, A., Kaiser, F., Al-Batran, S.-E., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., Kullmann, F., Moehler, M., Scheithauer, W., Held, S., Miller-Phillips, L., Modest, D. P., Jung, A., Kirchner, T., & Stintzing, S. (2021). FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab for advanced colorectal cancer: final survival and per-protocol analysis of FIRE-3, a randomised clinical trial. *British Journal of Cancer*, 124(3), 587-594. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01140-9>
- Helleman, J., Jansen, M. P., Ruigrok-Ritstier, K., van Staveren, I. L., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G., Sleijfer, S., Foekens, J. A., & Berns, E. M. (2008). Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. *Clin Cancer Res*, 14(17), 5555-5564. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-08-0555>
- Hörndler, C., Gallego, R., García-Albeniz, X., Alonso-Espinaco, V., Alonso, V., Escudero, P., Jimeno, M., Ortego, J., Codony-Servat, J., Fernández-Martos, C., Calatrava, A., Marín-Aguilera, M., Muñoz, J., Castellví-Bel, S., Castells, A., Rubini, M., Gascón, P., & Maurel, J. (2011). Co-expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and phosphorylated insulin growth factor receptor I (pIGF-1R) correlates with poor prognosis in patients with wild-type KRAS treated with cetuximab or panitumumab: a GEMCAD study. *Cancer Biology & Therapy*, 11(2), 177-183. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.2.13839>
- Hosch, S. B., Scheunemann, P., Lüth, M., Inndorf, S., Stoecklein, N. H., Erbersdobler, A., Rehders, A., Gundlach, M., Knoefel, W. T., & Izbicki, J. R. (2001). Expression of 17-1A antigen and complement resistance factors CD55 and CD59 on liver metastasis in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 5(6), 673-679. [https://doi.org/10.1016/s1091-255x\(01\)80111-6](https://doi.org/10.1016/s1091-255x(01)80111-6)
- Hothorn, T., & Lausen, B. (2002). Maximally Selected Rank Statistics in R. *R News*, 2, 3-5.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., & Liu, L. F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14873-14878.
- Hsiang, Y. H., Lihou, M. G., & Liu, L. F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*, 49(18), 5077-5082.

- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, *350*(23), 2335-2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- Ihrie, R. A., Marques, M. R., Nguyen, B. T., Horner, J. S., Papazoglu, C., Bronson, R. T., Mills, A. A., & Attardi, L. D. (2005). Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell*, *120*(6), 843-856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.008>
- Ihrie, R. A., Reczek, E., Horner, J. S., Khachatryan, L., Sage, J., Jacks, T., & Attardi, L. D. (2003). Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Current Biology*, *13*(22), 1985-1990. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.055>
- Jayat, C., & Ratinaud, M.-H. (1993). Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. *Biology of the Cell*, *78*(1), 15-25. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90110-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90110-Z)
- Jensen, N. F., Stenvang, J., Beck, M. K., Hanakova, B., Belling, K. C., Do, K. N., Viuff, B., Nygard, S. B., Gupta, R., Rasmussen, M. H., Tarpgaard, L. S., Hansen, T. P., Budinska, E., Pfeiffer, P., Bosman, F., Tejpar, S., Roth, A., Delorenzi, M., Andersen, C. L., . . . Moreira, J. M. (2015). Establishment and characterization of models of chemotherapy resistance in colorectal cancer: Towards a predictive signature of chemoresistance. *Molecular Oncology*, *9*(6), 1169-1185. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.02.008>
- Kamoshida, S., Matsuoka, H., Ishikawa, T., Maeda, K., Shimomura, R., Inada, K., & Tsutsumi, Y. (2004). Immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase (TS) and p16INK4a in advanced colorectal cancer: implication of TS expression in 5-FU-based adjuvant chemotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *34*(10), 594-601. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyh113>
- Kapoor, A., Yao, W., Ying, H., Hua, S., Liewen, A., Wang, Q., Zhong, Y., Wu, C. J., Sadanandam, A., Hu, B., Chang, Q., Chu, G. C., Al-Khalil, R., Jiang, S., Xia, H., Fletcher-Sananikone, E., Lim, C., Horwitz, G. I., Viale, A., . . . DePinho, R. A. (2014). Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell*, *158*(1), 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.003>
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H. J., Langer, C., Moore, M. J., & Zalberg, J. R. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, *359*(17), 1757-1765. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804385>
- Khan, I. A., Yoo, B. H., Masson, O., Baron, S., Corkery, D., Dellaire, G., Attardi, L. D., & Rosen, K. V. (2016). ErbB2-dependent downregulation of a pro-apoptotic protein Perp is required for oncogenic transformation of breast epithelial cells. *Oncogene*, *35*(44), 5759-5769. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.109>
- Koli, D. (2021, 20.04.2021). *FDA erteilt beschleunigte Zulassung von Sacituzumab Govitecan für das Blasenkarzinom*. Univadis. Retrieved 06.07. from <https://www.univadis.de/viewarticle/fda-erteilt-beschleunigte-zulassung-von-sacituzumab-govitecan-fur-das-blasenkarzinom-742615>
- Kong, C. S., Cao, H., Kwok, S., Nguyen, C. M., Jordan, R. C., Beaudry, V. G., Attardi, L. D., & Le, Q. T. (2013). Loss of the p53/p63 target PERP is an early event in oral carcinogenesis and correlates with higher rate of local relapse. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, *115*(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.10.017>
- Kopanos Christos, Tsiolkas Vasilis, Kouris Alexandros, E Chapple Charles, Albarca Aguilera Monica, Meyer Richard, & Andreas, M. (2019). VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*, *35*(11), 1978–1980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
- Kukcinaviciute, E., Jonusiene, V., Sasnauskiene, A., Dabkeviciene, D., Eidenaitė, E., & Laurinavicius, A. (2018). Significance of Notch and Wnt signaling for chemoresistance of colorectal cancer cells HCT116. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(7), 5913-5920. <https://doi.org/10.1002/jcb.26783>
- Kumbrink, J., Li, P., Pok-Udvari, A., Klauschen, F., Kirchner, T., & Jung, A. (2021). p130Cas Is Correlated with EREG Expression and a Prognostic Factor Depending on Colorectal

- Cancer Stage and Localization Reducing FOLFIRI Efficacy. *Int J Mol Sci*, 22(22).
<https://doi.org/10.3390/ijms222212364>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., . . . Maglott, D. R. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1062-d1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
- Lavie, Y., Fiucci, G., & Liscovitch, M. (1998). Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32380-32383. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32380>
- Law, C. W., Alhamdoosh, M., Su, S., Dong, X., Tian, L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2016). RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Res*, 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9005.3>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15(2), R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Lee, S. Y., Haq, F., Kim, D., Jun, C., Jo, H. J., Ahn, S. M., & Lee, W. S. (2014). Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS One*, 9(3), e90459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090459>
- Lee, U., Frankenberger, C., Yun, J., Bevilacqua, E., Caldas, C., Chin, S. F., Rueda, O. M., Reinitz, J., & Rosner, M. R. (2013). A prognostic gene signature for metastasis-free survival of triple negative breast cancer patients. *PLoS One*, 8(12), e82125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082125>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF). (2019). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. In (Vol. 2022).
- Li, A., Walling, J., Kotliarov, Y., Center, A., Steed, M. E., Ahn, S. J., Rosenblum, M., Mikkelsen, T., Zenklusen, J. C., & Fine, H. A. (2008). Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Molecular Cancer Research*, 6(1), 21-30. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-07-0280>
- Li, J., Chen, Q., Deng, Z., Chen, X., Liu, H., Tao, Y., Wang, X., Lin, S., & Liu, N. (2019). KRT17 confers paclitaxel-induced resistance and migration to cervical cancer cells. *Life Sciences*, 224, 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.065>
- Li, M., & Liu, Y. (2016). Topoisomerase I in Human Disease Pathogenesis and Treatments. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(3), 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.02.004>
- Li, Z. N., Zhao, L., Yu, L. F., & Wei, M. J. (2020). BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 8(3), 192-205. <https://doi.org/10.1093/gastro/goaa022>
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*, 1(6), 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
- Liu, R., Holik, A. Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H. S., Blewitt, M. E., Asselin-Labat, M. L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Research*, 43(15), e97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv412>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lyskjær, I., Kronborg, C. S., Rasmussen, M. H., Sørensen, B. S., Demuth, C., Rosenkilde, M., Johansen, A. F. B., Knudsen, M., Vang, S., Krag, S. R. P., Spindler, K. G., & Andersen, C. L. (2019). Correlation between early dynamics in circulating tumour DNA and outcome from FOLFIRI treatment in metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 11542. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47708-1>
- Malsy, M., Bitzinger, D., Graf, B., & Bundscherer, A. (2019). Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway.

- European Journal of Medical Research*, 24(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40001-019-0365-X>
- Marhold, M. (2022). Current state of clinical development of TROP2-directed antibody–drug conjugates for triple-negative breast cancer. *memo - Magazine of European Medical Oncology*, 15(2), 129-132. <https://doi.org/10.1007/s12254-021-00781-7>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Caveolae and signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(4), 225-237. <https://doi.org/10.1038/nrc3915>
- McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 25(6), 765-771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp053>
- McDonnell, S. J., Spiller, D. G., White, M. R. H., Prior, I. A., & Paraoan, L. (2019). ER stress-linked autophagy stabilizes apoptosis effector PERP and triggers its co-localization with SERCA2b at ER–plasma membrane junctions. *Cell Death Discovery*, 5(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0212-4>
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols*, 8(8), 1551-1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092>
- Midwood, K. S., & Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*, 3(3-4), 287-310. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0075-1>
- Misale, S., Di Nicolantonio, F., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., & Bardelli, A. (2014). Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discovery*, 4(11), 1269-1280. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-14-0462>
- Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., Liska, D., Valtorta, E., Schiavo, R., Buscarino, M., Siravegna, G., Bencardino, K., Cercek, A., Chen, C. T., Veronese, S., Zanon, C., Sartore-Bianchi, A., Gambacorta, M., Gallicchio, M., Vakiani, E., . . . Bardelli, A. (2012). Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486(7404), 532-536. <https://doi.org/10.1038/nature11156>
- Modest, D. P., Denecke, T., Pratschke, J., Ricard, I., Lang, H., Bemelmans, M., Becker, T., Rentsch, M., Seehofer, D., Bruns, C. J., Gebauer, B., Modest, H. I., Held, S., Folprecht, G., Heinemann, V., & Neumann, U. P. (2018). Surgical treatment options following chemotherapy plus cetuximab or bevacizumab in metastatic colorectal cancer-central evaluation of FIRE-3. *European Journal of Cancer*, 88, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.028>
- Molinari, C., Marisi, G., Passardi, A., Matteucci, L., De Maio, G., & Ulivi, P. (2018). Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123733>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., . . . Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34(3), 267-273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Murakami, T., Kikuchi, H., Ishimatsu, H., Iino, I., Hirotsu, A., Matsumoto, T., Ozaki, Y., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Fukushima, M., Baba, S., Kitagawa, K., Kitagawa, M., & Konno, H. (2017). Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. *British Journal of Cancer*, 117(9), 1360-1370. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.291>
- Nekrutenko, A., Taylor, J., Goecks, J., Blankenberg, D., Clements, D., Gu, Q., Afgan, E., & Jalili, V. (2020). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W395-W402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa434>
- Ohmachi, T., Tanaka, F., Mimori, K., Inoue, H., Yanaga, K., & Mori, M. (2006). Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 12(10), 3057-3063. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-1961>
- Orend, G., & Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters*, 244(2), 143-163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.017>
- Palmieri, V., Lucchetti, D., Maiorana, A., Papi, M., Maulucci, G., Calapà, F., Ciasca, G., Giordano, R., Sgambato, A., & De Spirito, M. (2015). Mechanical and structural comparison between

- primary tumor and lymph node metastasis cells in colorectal cancer. *Soft Matter*, 11(28), 5719-5726. <https://doi.org/10.1039/c5sm01089f>
- Palmieri, V., Lucchetti, D., Maiorana, A., Papi, M., Maulucci, G., Ciasca, G., Svelto, M., De Spirito, M., & Sgambato, A. (2014). Biomechanical investigation of colorectal cancer cells, *Lett.* 105, 123701 (2014) *Applied Physics Letters* 105. <https://doi.org/10.1063/1.4896161>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., Sopena, F., Lanas, A., . . . Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Petrelli, N., Herrera, L., Rustum, Y., Burke, P., Creaven, P., Stulc, J., Emrich, L. J., & Mittelman, A. (1987). A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 5(10), 1559-1565. <https://doi.org/10.1200/jco.1987.5.10.1559>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113.
- Phipson, B., Lee, S., Majewski, I. J., Alexander, W. S., & Smyth, G. K. (2016). ROBUST HYPERPARAMETER ESTIMATION PROTECTS AGAINST HYPERVARIABLE GENES AND IMPROVES POWER TO DETECT DIFFERENTIAL EXPRESSION. *Ann Appl Stat*, 10(2), 946-963. <https://doi.org/10.1214/16-aos920>
- Poon, M. A., O'Connell, M. J., Moertel, C. G., Wieand, H. S., Cullinan, S. A., Everson, L. K., Krook, J. E., Mailliard, J. A., Laurie, J. A., Tschetter, L. K., & et al. (1989). Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 7(10), 1407-1418. <https://doi.org/10.1200/jco.1989.7.10.1407>
- Pouya, F. D., Gazouli, M., Rasmi, Y., Lampropoulou, D. I., & Nemati, M. (2022). MicroRNAs and drug resistance in colorectal cancer with special focus on 5-fluorouracil. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07227-1>
- Pozzi, C., Cuomo, A., Spadoni, I., Magni, E., Silvola, A., Conte, A., Sigismund, S., Ravenda, P. S., Bonaldi, T., Zampino, M. G., Cancelliere, C., Di Fiore, P. P., Bardelli, A., Penna, G., & Rescigno, M. (2016). The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nature Medicine*, 22(6), 624-631. <https://doi.org/10.1038/nm.4078>
- Raja, S. A., Shah, S. T. A., Tariq, A., Bibi, N., Sughra, K., Yousuf, A., Khawaja, A., Nawaz, M., Mehmood, A., Khan, M. J., & Hussain, A. (2019). Caveolin-1 and dynamin-2 overexpression is associated with the progression of bladder cancer. *Oncology Letters*, 18(1), 219-226. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10310>
- Relative vs. absolute IC50. (2019, 27.05.2019). GraphPad Support. Retrieved 21.04 from <https://www.graphpad.com/support/faq/relative-vs-absolute-ic50/>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rivory, L. P. (2000). Metabolism of CPT-11. Impact on activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 922, 205-215. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb07039.x>
- Roberts, O., & Paraoan, L. (2020). PERP-ing into diverse mechanisms of cancer pathogenesis: Regulation and role of the p53/p63 effector PERP. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1874(1), 188393. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188393>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>

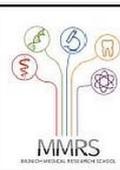
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- RTSF-Genomics-Core. *FastQC Tutorial & FAQ*. Michigan State University. Retrieved 31.01.2022 from <https://rtsf.natsci.msu.edu/genomics/tech-notes/fastqc-tutorial-and-faq/>
- Ru, B., Tong, Y., & Zhang, J. (2019). MR4Cancer: a web server prioritizing master regulators for cancer. *Bioinformatics*, 35(4), 636-642. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty658>
- Russo, M., Crisafulli, G., Sogari, A., Reilly, N. M., Arena, S., Lamba, S., Bartolini, A., Amodio, V., Magri, A., Novara, L., Sarotto, I., Nagel, Z. D., Pielt, C. G., Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., Bertotti, A., Trusolino, L., Corigliano, M., . . . Bardelli, A. (2019). Adaptive mutability of colorectal cancers in response to targeted therapies. *Science*, 366(6472), 1473-1480. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aav4474>
- Safran, M., Rosen, N., Twik, M., BarShir, R., Stein, T. I., Dahary, D., Fishilevich, S., & Lancet, D. (2021). The GeneCards Suite. In I. Abugessaisa & T. Kasukawa (Eds.), *Practical Guide to Life Science Databases* (pp. 27-56). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5812-9_2
- Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirodda, N., Elfring, G. L., & Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *New England Journal of Medicine*, 343(13), 905-914. <https://doi.org/10.1056/nejm200009283431302>
- Sathyanarayanan, A., Manda, S., Poojary, M., & Nagaraj, S. H. (2019). Exome Sequencing Data Analysis. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 164-175). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20094-0>
- Segeritz, C.-P., & Vallier, L. (2017). Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 151-172). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Selzer-Plon, J., Bornholdt, J., Friis, S., Bisgaard, H. C., Lothe, I. M., Tveit, K. M., Kure, E. H., Vogel, U., & Vogel, L. K. (2009). Expression of prostaticin and its inhibitors during colorectal cancer carcinogenesis. *BMC Cancer*, 9, 201. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-201>
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707-723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Sherman, B. T., Huang da, W., Tan, Q., Guo, Y., Bour, S., Liu, D., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2007). DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics*, 8, 426. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-426>
- Shi, M., He, X., Wei, W., Wang, J., Zhang, T., & Shen, X. (2015). Tenascin-C induces resistance to apoptosis in pancreatic cancer cell through activation of ERK/NF-κB pathway. *Apoptosis*, 20(6), 843-857. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1106-4>
- Shibata, J., Aiba, K., Shibata, H., Minowa, S., & Horikoshi, N. (1998). Detection and quantitation of thymidylate synthase mRNA in human colon adenocarcinoma cell line resistant to 5-fluorouracil by competitive PCR. *Anticancer Research*, 18(3A), 1457-1463. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673356>
- Shieh, D. B., Godleski, J., Herndon, J. E., 2nd, Azuma, T., Mercer, H., Sugarbaker, D. J., & Kwiatkowski, D. J. (1999). Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer*, 85(1), 47-57. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990101\)85:1<47::aid-cncr7>3.0.co;2-I](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990101)85:1<47::aid-cncr7>3.0.co;2-I)
- Shvartsur, A., & Bonavida, B. (2015). Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes & Cancer*, 6(3-4), 84-105. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.40>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21708>

- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3, Article3. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>
- Smyth, G. K. (2005). limma: Linear Models for Microarray Data. In R. Gentleman, V. J. Carey, W. Huber, R. A. Irizarry, & S. Dudoit (Eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* (pp. 397-420). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23
- Sobrero, A., Aschele, C., Guglielmi, A., Nobile, M. T., & Rosso, R. (1990). Resistance to 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine mechanisms and clinical implications. *Journal of Chemotherapy*, 2 Suppl 1, 12-16. <https://doi.org/10.1080/1120009x.1990.11738999>
- Soneson, C., & Delorenzi, M. (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-91>
- Song, K., Zhao, W., Wang, W., Zhang, N., Wang, K., & Chang, Z. (2018). Individualized predictive signatures for 5-fluorouracil-based chemotherapy in right- and left-sided colon cancer. *Cancer Science*, 109(6), 1939-1948. <https://doi.org/10.1111/cas.13622>
- Soumillon, M., Cacchiarelli, D., Semrau, S., van Oudenaarden, A., & Mikkelsen, T. S. (2014). *Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq* <https://doi.org/10.1101/003236>
- Stintzing, S., Modest, D. P., Rossius, L., Lerch, M. M., von Weikersthal, L. F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-Kaiser, U., Al-Batran, S. E., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., Kullmann, F., Stauch, M., Scheithauer, W., Held, S., Giessen-Jung, C., Moehler, M., . . . Heinemann, V. (2016). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 17(10), 1426-1434. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(16\)30269-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(16)30269-8)
- Stretch, C., Khan, S., Asgarian, N., Eisner, R., Vaisipour, S., Damaraju, S., Graham, K., Bathe, O. F., Steed, H., Greiner, R., & Baracos, V. E. (2013). Effects of sample size on differential gene expression, rank order and prediction accuracy of a gene signature. *PloS One*, 8(6), e65380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065380>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545-15550. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0506580102>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Suda, K., Mizuuchi, H., Maehara, Y., & Mitsudomi, T. (2012). Acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation—diversity, ductility, and destiny. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 807-814. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9391-7>
- Suda, K., Murakami, I., Sakai, K., Mizuuchi, H., Shimizu, S., Sato, K., Tomizawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Nishio, K., & Mitsudomi, T. (2015). Small cell lung cancer transformation and T790M mutation: complimentary roles in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 14447. <https://doi.org/10.1038/srep14447>
- Sun, L. L., Wu, J. Y., Wu, Z. Y., Shen, J. H., Xu, X. E., Chen, B., Wang, S. H., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2015). A three-gene signature and clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 136(6), E569-577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29211>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tagawa, S. T., Balar, A. V., Petrylak, D. P., Kalebasty, A. R., Loriot, Y., Fléchon, A., Jain, R. K., Agarwal, N., Bupathi, M., Barthelemy, P., Beuzeboc, P., Palmbos, P., Kyriakopoulos, C. E.,

- Pouessel, D., Sternberg, C. N., Hong, Q., Goswami, T., Itri, L. M., & Grivas, P. (2021). TROPHY-U-01: A Phase II Open-Label Study of Sacituzumab Govitecan in Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma Progressing After Platinum-Based Chemotherapy and Checkpoint Inhibitors. *Journal of Clinical Oncology*, 39(22), 2474-2485. <https://doi.org/10.1200/jco.20.03489>
- Tago, K., Funakoshi-Tago, M., Ohta, S., Kawata, H., Saitoh, H., Horie, H., Aoki-Ohmura, C., Yamauchi, J., Tanaka, A., Matsugi, J., & Yanagisawa, K. (2019). Oncogenic Ras mutant causes the hyperactivation of NF- κ B via acceleration of its transcriptional activation. *Molecular Oncology*, 13(11), 2493-2510. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12580>
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., . . . Forbes, S. A. (2019). COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D941-d947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, 13(9), 2129-2141. <https://doi.org/10.1101/gr.772403>
- Tomita, N., Jiang, W., Hibshoosh, H., Warburton, D., Kahn, S. M., & Weinstein, I. B. (1992). Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer Research*, 52(24), 6840-6847. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/52/24/6840.full.pdf>
- Triple-negativer Brustkrebs: Überlebensvorteil mit Sacituzumab Govitecan.* (2022). Unabhängiges Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG). Retrieved 06.07 from https://www.iqwig.de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen-detailseite_61970.html
- Valenzuela, M., Amato, R., Sgura, A., Antoccia, A., & Berardinelli, F. (2021). The Multiple Facets of ATRX Protein. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092211>
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J. Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., . . . Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 27(8), 1386-1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>
- Van Cutsem, E., Labianca, R., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Topham, C., Tabernero, J., André, T., Sobrero, A. F., Mini, E., Greil, R., Di Costanzo, F., Collette, L., Cisar, L., Zhang, X., Khayat, D., Bokemeyer, C., Roth, A. D., & Cunningham, D. (2009). Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3117-3125. <https://doi.org/10.1200/jco.2008.21.6663>
- Van Cutsem, E., & Oliveira, J. (2009). Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 20 Suppl 4, 61-63. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp130>
- Varghese, V., Magnani, L., Harada-Shoji, N., Mauri, F., Szydlo, R. M., Yao, S., Lam, E. W., & Kenny, L. M. (2019). FOXM1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression. *Scientific Reports*, 9(1), 1505. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38017-0>
- Vatandoust, S., Price, T. J., & Karapetis, C. S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11767-11776. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11767>
- Vermaat, J. S., Nijman, I. J., Koudijs, M. J., Gerritse, F. L., Scherer, S. J., Mokry, M., Roessingh, W. M., Lansu, N., de Bruijn, E., van Hillegersberg, R., van Diest, P. J., Cuppen, E., & Voest, T. J. (2019). The impact of the tumor microenvironment on colorectal cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 129(12), 4000-4011. <https://doi.org/10.1172/JCI125800>

- E. E. (2012). Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res*, 18(3), 688-699. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-11-1965>
- Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9120171>
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L., & Zhang, X. (2009). NF- κ B Signaling Pathway, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(5), 327-334. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.43>
- Warnes, G. (2019, 4.12.2019). *DNA fragmentation*. Institute of Cell and Molecular Science, The Blizard Building, Barts and The London School of Medicine and Dentistry. Retrieved 10.05. from <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/apoptosis/dnafragmentation/>
- Watanabe, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Matsuda, K., Ishihara, S., Nozawa, K., Inuma, H., Konishi, T., Horie, H., Ikeuchi, H., Eshima, K., & Muto, T. (2011). Gene expression signature and response to the use of leucovorin, fluorouracil and oxaliplatin in colorectal cancer patients. *Clinical & Translational Oncology*, 13(6), 419-425. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0676-z>
- Watson, L. A., Goldberg, H., & Berube, N. G. (2015). Emerging roles of ATRX in cancer. *Epigenomics*, 7(8), 1365-1378. <https://doi.org/10.2217/epi.15.82>
- Wick, W. (2021). *Gliome, S2k-Leitlinie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Retrieved 16.06 from www.dgn.org/leitlinien
- Wittekind, C. (2017). *TNM - Klassifikation maligner Tumoren* (Vol. 8). Wiley-VCH.
- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*, 2(9), 823-830. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.Cir-14-0112>
- Xin-Xiang Li, Hong-Tu Zheng, Jun-Jie Peng, Li-Yong Huang, De-Bing Shi, Lei Liang, & Cai, S.-J. (2014). RNA-seq reveals determinants for irinotecan sensitivity in CRC cell lines. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(5):2729-2736, 7, 2729-2736.
- Yang, S., Dong, Q., Yao, M., Shi, M., Ye, J., Zhao, L., Su, J., Gu, W., Xie, W., Wang, K., Du, Y., Li, Y., & Huang, Y. (2009). Establishment of an experimental human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with high bone metastases potency by (99m)Tc-MDP bone scintigraphy. *Nuclear Medicine and Biology*, 36(3), 313-321. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.12.007>
- Yang, Z., Zhang, C., Feng, Y., Quan, M., Cui, Y., & Xuan, Y. (2020). Tenascin-C predicts poor outcomes for patients with colorectal cancer and drives cancer stemness via Hedgehog signaling pathway. *Cancer Cell International*, 20(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01188-w>
- Yang, Z., Zhang, C., Qi, W., Cui, C., Cui, Y., & Xuan, Y. (2018). Tenascin-C as a prognostic determinant of colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation. *Experimental and Molecular Pathology*, 105(2), 216-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.08.009>
- Yoon, W.-H., Lee, S.-K., Song, K.-S., Kim, J.-S., Kim, T.-D., Li, G., Yun, E.-J., Heo, J.-Y., Jung, Y.-J., Park, J.-I., Kweon, G.-R., Koo, S.-H., Park, H.-D., Hwang, B.-D., & Lim, K. (2008). The tumorigenic, invasive and metastatic potential of epithelial and round subpopulations of the SW480 human colon cancer cell line. *Mol Med Rep*, 1(5), 763-768. <https://doi.org/10.3892/mmr.00000026>
- Young, P. E., Womeldorph, C. M., Johnson, E. K., Maykel, J. A., Brucher, B., Stojadinovic, A., Avital, I., Nissan, A., & Steele, S. R. (2014). Early detection of colorectal cancer recurrence in patients undergoing surgery with curative intent: current status and challenges. *Journal of Cancer*, 5(4), 262-271. <https://doi.org/10.7150/jca.7988>
- Zbigniew, D., & Xuan, H. (2004). Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*, 60(1), 5.7.1-5.7.18.
- Zhai, T., Muhanhali, D., Jia, X., Wu, Z., Cai, Z., & Ling, Y. (2019). Identification of gene co-expression modules and hub genes associated with lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. *Endocrine*, 66(3), 573-584. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02021-9>
- Zheng, Y., Zhou, J., & Tong, Y. (2015). Gene signatures of drug resistance predict patient survival in colorectal cancer. *Pharmacogenomics Journal*, 15(2), 135-143. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.45>

- Zhou, M., Li, M., Liang, X., Zhang, Y., Huang, H., Feng, Y., Wang, G., Liu, T., Chen, Z., Pei, H., & Chen, Y. (2019). The Significance of Serum S100A9 and TNC Levels as Biomarkers in Colorectal Cancer [Research Paper]. *Journal of Cancer*, 10(22), 5315-5323. <https://doi.org/10.7150/jca.31267>
- Zhou, Y., Guo, Y., & Wang, Y. (2022). Identification and validation of a seven-gene prognostic marker in colon cancer based on single-cell transcriptome analysis. *IET Systems Biology*, 16(2), 72-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1049/syb2.12041>
- Zhuo, J., Tan, E. H., Yan, B., Tochwawng, L., Jayapal, M., Koh, S., Tay, H. K., Maciver, S. K., Hooi, S. C., Salto-Tellez, M., Kumar, A. P., Goh, Y. C., Lim, Y. C., & Yap, C. T. (2012). Gelsolin induces colorectal tumor cell invasion via modulation of the urokinase-type plasminogen activator cascade. *PloS One*, 7(8), e43594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043594>
- Zuo, S., Dai, G., & Ren, X. (2019). Identification of a 6-gene signature predicting prognosis for colorectal cancer. *Cancer Cell International*, 19(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0724-7>

Eidesstattliche Erklärung**Eidesstattliche Versicherung**

Peschel, Christiane Andrea

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Molekulare Mechanismen der pharmakologischen Resistenz kolorektaler
Karzinomzelllinien gegen das Chemotherapieregime FOLFIRI

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 09.03.2023

Ort, Datum

Christiane Peschel

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei beiden Doktorvätern und Betreuern PD. Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink und Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung bedanken, die mir durch die Überlassung des Themas die Promotion am Pathologischen Institut der LMU ermöglicht haben. Danke für Eurer beide Unterstützung, Geduld und die vielen guten Anregungen!

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und dann Doktorvater PD Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink. Du hast mich über zahlreiche Stunden bei diesem Projekt begleitet, mit mir Ideen erarbeitet, mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet, warst bei etwaigen Fragen immer erreichbar und hast mich durch Deine wertvollen Verbesserungsvorschläge enorm weitergebracht.

Herzlich möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam bedanken, vor allem bei Sabine Sagebiel-Kohler und Agnes Pok-Udvari! Ob beim Erlernen der Zellkultur, Pipettieren der RT-qPCRs, Durchführung der NGS und der Durchflusszytometrie, es hat mir nie an Unterstützung und problemorientierten Lösungsansätzen gefehlt!

Ebenfalls danke ich Herrn Sebastian Heuke für die Präparation der RNA-Sequenzierung-Library!

Zuletzt möchte ich ein großes Dankeschön an meine Eltern aussprechen, die mich während meiner Arbeit in jeder Hinsicht immer unterstützt und ermutigt haben!