

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken)  
im Universitätsklinikum Schleswig - Holstein, Campus Kiel  
an der Christian – Albrechts - Universität zu Kiel

**Validierung der differentiellen Expression von hnRNPA1, PLEKHA2  
und YY1AP1 in Abhängigkeit vom KRAS-Genotyp beim kolorektalen  
Karzinom**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Vanessa Nikolai**  
**geb. Ciavarrella**  
aus Hamburg

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter: Priv. -Doz Dr. Martin Neumann, Klinik für Innere Medizin II  
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.11.2021

gez.: Priv.-Doz. Dr. Ilske Oschlies

Vorsitzende der Prüfungskommission

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Pathologie	2
1.3 Pathogenese	5
1.4 Therapie	8
1.5 Fragestellung	9
<b>2 MATERIAL</b>	<b>10</b>
2.1 Patientenkollektiv	10
2.2 Antikörper	10
2.3 Chemikalien und Reagenzien	11
2.4 Geräte	12
2.5 Primer und Probes	12
2.6 Software	12
2.7 Verbrauchsmaterialien	13
<b>3 METHODEN</b>	<b>14</b>
3.1 Proteinbiochemie	14
3.1.1 Immunhistochemie und Vorbereitung	14

3.1.1.1	TMA-Herstellung	14
3.1.1.2	Paraffinschnitttherstellung	14
3.1.1.3	Immunhistochemie	14
3.1.1.4	Beurteilung der Immunhistochemie	15
3.1.2	Western Blot und Vorbereitung	15
3.1.2.1	Herstellung eines Proteinlysats aus Karzinomzelllinien	15
3.1.2.2	Herstellung eines Proteinlysats aus Gewebe	16
3.1.2.3	Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate	16
3.1.2.4	SDS-Page	16
3.1.2.5	Western Blot	16
3.1.2.6	Proteindetektion	17
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologie (YY1AP1)</b>	<b>17</b>
3.2.1	RNA-Isolation	17
3.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	17
3.2.3	DNase-Verdau	18
3.2.4	cDNA-Synthese	18
3.2.5	Qualitative PCR	18
3.2.6	Quantitative RT-PCR	19
3.2.7	Relative Quantifizierung	20
<b>3.3</b>	<b>KRAS-Mutationsanalyse</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Statistik</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des Patientenkollektivs</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Genexpressionsanalyse kolorektaler Karzinom mit und ohne KRAS-Mutation</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Literaturrecherche</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Translationale Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1 in kolorektalen Karzinomen</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Testung der anti-YY1AP1-Spezifität und Evaluation der YY1AP1-Expression in unterschiedlichen KRK-Genotypen im Western Blot</b>	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Validierung der differentiellen Expression von YY1AP1/GON4L durch Immunhistochemie</b>	<b>33</b>
<b>4.7</b>	<b>Validierung der differentiellen Expression von hnRNPA1 und PLEKHA2 durch Immunhistochemie</b>	<b>34</b>

<b>4.8</b>	<b>Korrelation der translationalen Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1 mit dem KRAS-Genotyp</b>	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Validierung der differentiellen Genexpression von YY1AP1 durch qRT-PCR</b>	<b>39</b>
<b>4.10</b>	<b>Korrelation der translationalen Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1/GON4L mit klinisch-pathologischen Parametern</b>	<b>39</b>
<b>4.11</b>	<b>Die prognostische Signifikanz der hnRNPA1- und PLEKHA2-Expression in der univariaten Überlebensanalyse</b>	<b>42</b>
<b>4.12</b>	<b>Multivariate Überlebensanalyse von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>64</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AKT.....	<i>Protein Kinase B</i>
APC.....	<i>Adenomatöse Polyposis Coli</i>
BKM120.....	<i>Buparlisib</i>
BMBF.....	<i>Bundesministerium für Bildung und Forschung</i>
BRCA1.....	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2.....	<i>Breast Cancer 2</i>
BSA.....	<i>Rinderserumalbumin</i>
CDKN2A.....	<i>Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA.....	<i>komplementäre DNA</i>
CED.....	<i>Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen</i>
Ct-Werte.....	<i>threshold cycle - Werte</i>
DAB.....	<i>3,3'-Diaminobenzidin</i>
DCC.....	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
dH <sub>2</sub> O.....	<i>deionisiertes Wasser</i>
dNTPs.....	<i>Deoxynukleotid Triphosphat</i>
EGFR.....	<i>Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
EpCAM.....	<i>Epitheliales Zelladhäsionsmolekül</i>
ERK.....	<i>Extrazellulär signalregulierte Kinase</i>
FAP.....	<i>Familiäre Adenomatöse Polypose</i>
FGF-2.....	<i>Fibroblast Growth Factor - 2</i>
GON4L.....	<i>Gon-4 Like</i>
GTPase.....	<i>GuanosinTriPhosphatase</i>
HE.....	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HNPCC.....	<i>Hereditäres Nicht Polypose assoziiertes Kolorektales Karzinom</i>
hnRNPA1.....	<i>heterogeneous nuclear RibonucleoProtein A1</i>
HPRT1.....	<i>Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase 1</i>
HRAS.....	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
IRS.....	<i>Immunreaktivitätsscore</i>
KRAS.....	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, Kirsten RAAt Sarcoma</i>
KRK.....	<i>Kolorektales Karzinom</i>
LoVo.....	<i>Humane Kolon-Tumorzellen</i>
MEK.....	<i>Mitogen-activierte Proteinkinase</i>

mRNA .....	<i>Boten-RNA</i>
MSI-H.....	<i>Hohe Mikrosatelliteninstabilität</i>
MTOR .....	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
<i>MUTYH</i> .....	<i>mutY DNA glycosylase</i>
Myc.....	<i>MYC Protoonkogen</i>
negRT .....	<i>Reverse Transcriptase negativ</i>
NRAS .....	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
NTC.....	<i>No Template Control</i>
OS.....	<i>Gesamtüberleben</i>
<i>PALB2</i> .....	<i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
PBS-Puffer .....	<i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>
PDK1 .....	<i>Phosphoinositol-Dependent-Kinase 1</i>
PFS .....	<i>Progressionsfreies Überleben</i>
<i>PGBD</i> .....	<i>PiggyBac Transposable Element Derived</i>
PH.....	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI .....	<i>Phosphoinositid</i>
PI3K .....	<i>Phosphoinositid-3-Kinasen</i>
<i>PIK3CA</i> .....	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Gen</i>
PLEKHA2.....	<i>Pleckstrin Homology Domain Containing A2</i>
<i>PTEN</i> .....	<i>Phosphatase und Tensin Homolog</i>
RAF .....	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RIPA-Puffer .....	<i>Radioimmunpräzipitationas-Assay - Puffer</i>
RNA .....	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT-qPCR.....	<i>Real-Time quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
SMAD .....	<i>SMA ("small" worm phenotype) and Drosophila MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") family of genes</i>
TBS-Puffer .....	<i>Tris-gepufferte Kochsalzlösung</i>
TFRC.....	<i>Transferrinrezeptor</i>
TGF .....	<i>Transforming Growth Factor</i>
TMA .....	<i>Tissue Micro Array</i>
TNM.....	<i>Tumor-Nodus-Metastase</i>
<i>TP53</i> .....	<i>Tumor Protein 53</i>
UICC .....	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF .....	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR.....	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor</i>

WHO.....	Worldgesundheitsorganization
WNT.....	Wg (wingless) INT - Signalweg
YY1AP1 .....	YY1-Associated Protein 1

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TNM-Stadien (gekürzt) [10, 37]. .....	3
Tabelle 2: UICC-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms (gekürzt) [4, 10]. .....	4
Tabelle 3: Primer-Eigenschaften für qualitative und quantitative Real-Time-PCR .....	19
Tabelle 4: Charakterisierung des Patientenkollektivs .....	24
Tabelle 5: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für YY1AP1/GON4L* .....	36
Tabelle 6: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für hnRNPA1* .....	38
Tabelle 7: Korrelation der gemittelten relativen qRT-PCR-Expressionswerte zum KRAS-Genotyp und der Tumorentität für YY1AP1 und GON4L. ....	39
Tabelle 8: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für PLEKHA2* .....	41
Tabelle 9: Multivariate Überlebensanalyse anhand der Cox-Regressionsmodell für hnRNPA1 .....	43

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein.....	6
Abbildung 2: KRAS-Aktivierung (vereinfachtes Modell).....	7
Abbildung 3: Grafische Darstellung des Studiendesigns .....	22
Abbildung 4: Bimodale Verteilung der ausgewählten Gene.....	25
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von hnRNPA1. ....	27
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung von PLEKHA2. ....	28



Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von YY1AP1/GON4L.....	29
Abbildung 8: Immunhistochemische Vergleichsfärbung zwischen YY1AP1/GON4L, LGR5 und Synaptophysin.....	30
Abbildung 9: Western Blot mit Nachweis der YY1AP1-Proteinexpression in einer YY1AP1- Positiv-/Negativkontrolle, sowie in KRK-Zelllinien mit unterschiedlichen KRAS-Genotypen. .....	31
Abbildung 10: Western Blot mit anti-YY1AP1 an KRK-Zelllinien unterschiedlicher KRAS- Genotypen.....	32
Abbildung 11: Western Blot mit anti-YY1AP1 an Nichttumorgewebe und KRK- Gewebeproben unterschiedlicher KRAS-Genotypen.....	32
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung des mutationsanalytisierten Schnittes für YY1AP1/GON4L.....	34
Abbildung 13: Univariate Überlebensanalyse von PLEKHA2 und hnRNPA1.....	42

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) beschreibt alle malignen Tumoren im Bereich des Kolons (Grimmdarm) und des Rektums (Mastdarm) und bildet den größten Anteil aller Darmtumoren. Es gehört weltweit mit 746.000 Fällen bei den Männern an dritter Stelle und bei den Frauen mit 614.000 Fällen (2012) an zweiter Stelle zu den häufigsten Tumorentitäten weltweit [31]. Männer besitzen dabei insgesamt ein höheres Risiko an KRK zu erkranken. Weltweit schwanken die Inzidenzraten um das 10-fache, wobei fast 55% der Fälle in den Industriestaaten auftraten. So wurde 2012 die höchste Inzidenz in Australien/Neuseeland mit 32,2 Fällen pro 100.000 Einwohnern im Gegensatz zu Westafrika mit der niedrigsten Inzidenzrate von 3,8 Fälle pro 100.000 Einwohner verzeichnet [31]. Dies zeigt die wichtige Rolle von unterschiedlichen Umweltfaktoren und Essensgewohnheiten für die Ätiologie des KRK. Weiterhin scheint auch ein geringer sozialer Status die Entwicklung eines KRKs mit bis zu 30-fach erhöhtem Risiko zu fördern, da hier Übergewicht, Rauchen, Inaktivität und ungesunde Essgewohnheiten häufiger verzeichnet werden [16, 28].

Weltweit ist die Inzidenz des KRK in den letzten 30 Jahren signifikant angestiegen. Auffallend ist dies besonders in ausgewählten Staaten Osteuropas, Asiens und Südamerikas, die von einer Transformationsökonomie betroffen sind, während in Deutschland eher stabile bis leicht steigende Inzidenzraten aufgezeichnet wurden [17]. Der Erkrankungsgipfel des KRK liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [36], wobei neuere amerikanische Studien interessanterweise steigende Inzidenzen in der Gruppe von unter 50-Jährigen zeigten, während in älteren Vergleichsgruppen die Inzidenz eher zu fallen schien [26, 71]. Dabei sind die im jüngeren Alter diagnostizierten KRK eher durch höhere Stadien und Tumoraggressivität ausgezeichnet [26].

Insgesamt wird die Mortalität jedoch, besonders in den Industriestaaten, als tendenziell sinkend beschrieben [16]. So wurden in 2012 weltweit 694.000 Todesfälle durch KRK beschrieben, wobei jedoch über 50% in unterentwickelten Regionen der Welt auftraten [31].

Durch die hohe und in der Tendenz immer noch steigende Inzidenz des KRK weltweit, sind Studien zu relevanten Signalwegen und Auswirkungen von Genmutationen bis heute weiterhin von großem Interesse. Signalwege und Genmutationen haben einen hohen Einfluss

auf die Tumoraggressivität und mögliche Therapieansätze, um das progressionsfreie sowie Gesamtüberleben weiterhin zu verbessern.

## 1.2 Pathologie

Makroskopisch lassen sich verschiedene Wachstumstypen des KRK unterscheiden: polypös-exophytischer Typ (blumenkohlartige Tumoren), schüsselförmig-exulzerierter Typ (zentrale Ulzerationen mit kraterartig aufgeworfenen Rändern), insulärer Typ, zirkulärer Typ und letztlich der diffus-infiltrierende Typ. Die Wachstumsform muss bei der Probeentnahme Beachtung finden und kann ein Hinweis auf das Metastasierungsverhalten geben, da beispielsweise der polypöse seltener und später metastasiert als der diffus-infiltrierende Typ [37].

Histologisch finden sich beim KRK am häufigsten Adenokarzinome (circa 90%), gefolgt von muzinösen Karzinomen (5-10%) und sehr selten Siegelring-, Plattenepithel-, kleinzelligen und undifferenzierten Karzinomen, Lymphomen, neuroendokrinen Tumoren oder Sarkomen[40, 53, 74]. Die Prognose und Therapie hängen vom Tumortyp ab.

Die histologische Klassifikation der kolorektalen Neoplasien wird mit der „*WHO Classification of Tumours of the Digestive System*“ vorgegeben [10].

Neben dem oben genannten Tumortyp unterscheidet die WHO außerdem drei (bzw. zwei) Differenzierungsgrade: das hoch- (entsprechend UICC: G-1) und mittelgradig differenzierte Adenokarzinom (UICC: G-2) Adenokarzinome mit niedrigem Malignitätsgrad (low grade) und das gering differenzierte Adenokarzinom (UICC: G-3) mit hohem Malignitätsgrad (high grade). Letztlich gibt es noch das undifferenzierte Karzinom, welches dem UICC G-4 entspricht. Diese Unterscheidung wirkt sich auf die Therapiemöglichkeiten aus, da beispielsweise beim Rektumkarzinom (pT1) nur bei niedrigen Malignitätsgraden eine lokale chirurgische Tumorexzisionen durchgeführt werden sollte, während bei pT1-high grade-Karzinome aufgrund des erhöhtes Risikos für Lymphknotenmetastasen eine primär radikale chirurgische Exzision empfohlen wird [4]. Allerdings bedarf es auch in der low grade-Situation einer lokalen endoskopischen Nachsorge nach einem halben Jahr.

Für die prognostische Einschätzung wird außerdem die TNM-Klassifikation der UICC (*8<sup>th</sup> edition, 2010*) angewandt (siehe **Tabelle 1** und **Tabelle 2**).

Tabelle 1: TNM-Stadien (gekürzt) [10, 37].

T (Primärtumor)	
TX	Der Primärtumor kann nicht klinisch beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N (Klinischer Lymphknotenbefall)	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Regionäre Lymphknoten tumorfrei
N1	Metastasen in 1-3 regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionalen Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	
M0	M (Fernmetastasen)
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: UICC-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms (gekürzt) [4, 10].

UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/ T2	N0	M0
Stadium II	T3/ T4	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1/N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Bezüglich der Lokalisation finden sich die meisten KRK im Colon sigmoideum oder Rektum, wobei in den letzten Jahren eine Rechtsverschiebung in proximalere Lokalisationen beobachtet wurde [12, 48, 74]. Diese Entwicklung fand sich in mehreren Studien signifikant bei Frauen, älteren Menschen über 70 Jahren und bei Menschen mit einer höheren Rate an Komorbiditäten [8, 69]. Dabei zeigen sich die proximalen Tumoren eher weniger differenziert, lokal weiter fortgeschritten und mit einer erhöhten Rate von muzinösen Tumoren sowie Metastasierungen. Insgesamt gesehen ist das Überleben signifikant reduziert bei rechtsseitigen (proximalen) Tumoren verglichen mit den linksseitigen Tumoren[8].

Als Gründe für die Rechtsverschiebung werden Veränderungen des Lebensstils, der demografische Wandel oder auch bessere Diagnostik und Vorsorge aufgeführt [69, 77].

Andere Studien hingegen wie beispielsweise eine Beobachtungsstudie im Iran zeigen keinen signifikanten Inzidenzanstieg der rechtsseitigen KRK, weshalb eine endgültige Klärung der Bedeutung letztlich noch aussteht [63].

Zuletzt zeigen die unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen des KRK auch genetische Unterschiede. So finden sich z.B. Tumoren mit höherer Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H) und RAS-Mutationen eher im Caecum, im Colon ascendens und im Colon transversum als an anderen Lokalisationen [43, 74].

### 1.3 Pathogenese

Die Karzinogenese im Kolon folgt einer multifaktoriellen Genese, wobei exogene Faktoren wie Ernährung und kanzerogene Noxen, sowie endogene Faktoren wie Genetik und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) eine Rolle spielen.

So sind circa 5% der KRK durch hereditäre Syndrome wie z.B. die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) oder das hereditäre nicht-Polypose-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC/Lynch-Syndrom) bedingt. In der Studie von Yurgelun et al. zeigten sich bei mehreren FAP-Patienten weitere begleitende Mutationen wie *APC*, *MUTYH*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CDKN2A* und *TP53*, für welche teilweise das Risiko eines möglichen Beitrags zur Karzinogenese noch nicht vollständig geklärt ist [88].

Sowohl die hereditären als auch die sporadischen KRKs folgen überwiegend der von Bert Vogelstein beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz (1988) [81]. Aus gesunder Schleimhaut entwickeln sich durch Mutationen zunächst gutartige *low grade* Adenome (villös, tubulär und tubulovillös), die schrittweise durch den Erwerb weiterer Mutationen in *high grade* Adenome und schließlich in invasiv wachsende Adenokarzinome übergehen. Während der Progression werden verschiedene Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. Vogelstein unterscheidet dabei zwischen Gatekeeper Genen und Caretaker Genen. Gatekeeper Gene kodieren für Proteine, die das Zellwachstum von möglichen Tumorzellen sowie Mutationen verhindern und zur Zellproliferation führen. Während Caretaker Gene hingegen Proteine kodieren, die das Genom stabilisieren [32].

Zudem müssen in mindestens vier bis fünf Genen Mutationen vorliegen, um ein Karzinom entstehen zu lassen. Zwar besteht meistens eine präferierte Reihenfolge, die jedoch letztlich nicht zwingend vorhanden sein muss. Vielmehr scheint die Summe der Mutationen eine Rolle bei der Karzinogenese des KRKs zu spielen und eben nicht die Reihenfolge.

In dem von Vogelstein vorgestellten Model (siehe **Abbildung 1**) zeigt sich zunächst die Inaktivierung des *APC*-Tumorsuppressorgens, mit folgender *KRAS*-Onkogen-Aktivierung, Allel-Deletionen in Chromosom 5,17 und 18 (Tumorsuppressorgene), DCC-Alterationen und Inaktivierung des Tumorsuppressors-p53.

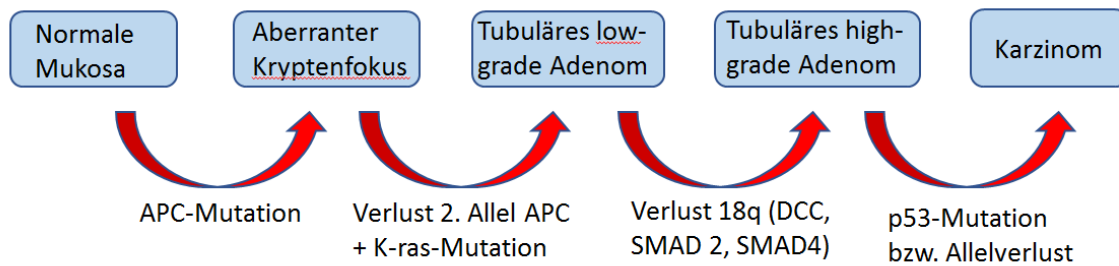


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein

Das *APC*-Tumorsuppressorgen spielt eine wichtige Rolle als Inhibitor im WNT-Signalweg und ist somit für den Abbau von  $\beta$ -Catenin, einem Zelladhäsionsprotein, welches sich bei mehreren Tumorentitäten erhöht gezeigt hat, mitverantwortlich [7].

*P53* gehört zu den bekanntesten Tumorsuppressorgen und führt zum Zellzyklusarrest wie auch zur Apoptose unter zellulärem Stress [7]. Die Mutation lässt sich in fast 50% aller Tumoren beobachten und wird auch der „Wächter des Genoms“ genannt. Beim KRK lässt sich die Mutation in bis zu 40-50% finden und beeinflusst das biologische Verhalten des Tumors sowie die Therapiemöglichkeiten [50].

*SMAD2* und *SMAD4* gehören ebenfalls zu den Tumorsuppressorgen und sind intrazelluläre Transmitterproteine im TGF- $\beta$ -Signalweg, welcher in vielen zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Apoptose eine wichtige Rolle spielt [7].

*KRAS*-Mutationen treten beim KRK in bis zu 30-50 % der Fälle auf, meist betroffen sind dabei Kodon 12 und 13 (97%) [5]. *KRAS* kodiert hierbei für ein P21 Ras-Protein, einer kleinen Guanosintriphosphatase (GTPase), welche an der Plasmamembran lokalisiert ist und von einer nahegelegenen transmembranösen Rezeptor-Tyrosinkinase (wie z.B. dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor [EGFR]) aktiviert wird und damit zu einer Kaskade von unterschiedlichen Effektorproteinen führt (siehe **Abbildung 2**) [11]. Das aktivierte Ras-Protein wiederum reguliert vielfältige zelluläre Funktionen wie die Zellproliferation, Apoptose, Migration und Zelldifferenzierung [27].

Durch die *KRAS*-Mutation kommt es zu einer Akkumulation des aktivierten, GTP-gebundenen Ras-Proteins und dadurch auch zu einer permanenten Aktivierung des PI3K-AKT-MTOR- und RAF-MEK-ERK-Signalweges [23]. Das mutierte *KRAS* wurde dabei mit

schlechterem Überleben der Patienten, aggressiverem Verhalten höherer Tumorstadien, sowie mit abweichendem Metastasierungsverhalten assoziiert [2, 3, 45, 59, 68].

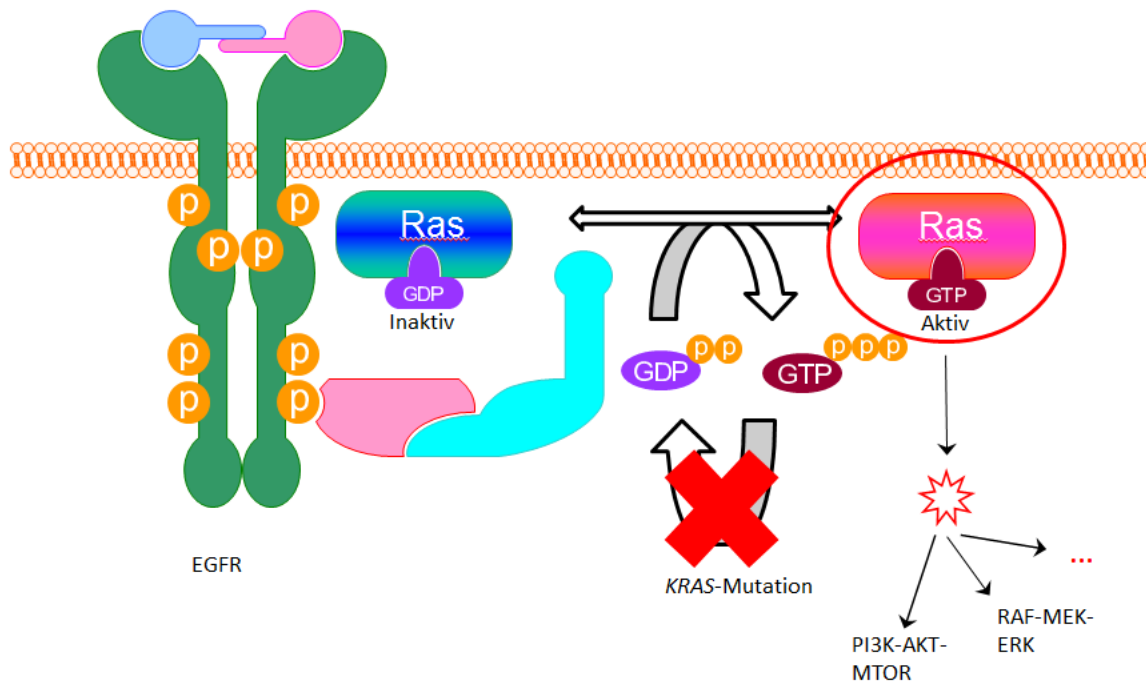


Abbildung 2: KRAS-Aktivierung (vereinfachtes Modell)

Proteine der RAF-Familie (Raf-1, A-Raf, and B-Raf) gehören zu den Serin/Threonin Kinasen, die an die GTP-Effektoreinheit binden und somit die Transduktion zur Plasmamembran hin induzieren [6, 30]. Dadurch erfolgt eine Phosphorylierung des RAF-Proteins, welches wiederum andere Proteine wie MEK und darüber ERK aktiviert und so zu den oben genannten Effekten führt [24, 64]. Der RAF-MEK-ERK-Signalweg bestimmt unter anderem Zellteilung und -wachstum [66].

Die PI3Ks fungieren ebenfalls als wichtige RAS-abhängige Mediatoren und haben darüber Einfluss auf das Überleben, die Proliferation und die zytoskelettale Reorganisation von Zellen [13, 15, 80]. Durch Missense-Mutationen im *PIK3CA*-Gen, welche man häufig in Brust-, Kolon-, Lungen- und Hirntumoren findet, wird z.B. die Aktivität der PIK3CA-Kinasen gefördert [60, 67, 72].

Erweiterte molekulare Untersuchungen konnten Vogelsteins These des Adenom-Karzinom-Sequenz von 1988 weiterhin bestätigen und sogar durch neue wichtige Erkenntnisse über die Kaskaden wie beispielsweise WNT-, RAS-MEK-, PI3K-, TGF- $\beta$ - und



P53, welche zur Initiation und Regression von Neoplasien beim KRK beitragen, ergänzen, um letztlich mögliche Angriffspunkte für neue Therapien zu finden [58].

#### 1.4 Therapie

Die Therapie des KRK richtet sich nach Lokalisation, Metastasierung und Tumorstadium. In der kurativen Therapie sollte primär eine chirurgische Therapie nach onkologischen Grundsätzen erfolgen, während in der palliativen Situation eine individuelle Entscheidung nach Allgemeinzustand, der Krankheitsausdehnung und der Molekularbiologie des Tumors getroffen werden muss. Eine Ausnahme bilden die UICC-Stadien II-III beim Rektumkarzinom, wo die S3-Leitlinie primär eine neoadjuvante Radiochemotherapie empfiehlt [4].

In der Adjuvanz finden Oxaliplatin, 5-Fluoruracil/Folinsäure, Capecitabine und Levamisol Anwendung, während die Therapie mit monoklonalen Antikörpern erst in der Zweitlinientherapie oder in Kombination mit Chemotherapien in der Erstlinie stattfindet. Hierbei finden sich zielgerichtete Therapien mit monoklonalen EGFR-Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab, welche sich vorteilhaft für KRK mit metastasierten *KRAS*-Wildtyp zeigten [29, 65, 78].

Zudem werden anti-VEGFs wie Bevacizumab in der metastasierten Situation in der Erstlinientherapie hinzugenommen und führen zu einer signifikanten Steigerung des progressfreien Überlebens (PFS) und dem Gesamtüberleben (OS) [42]. In der Zweitlinientherapie werden weitere anti-VEGF (wie Aflibercept) und anti-VEGFR (wie Ramucirumab) verwendet. In späteren Linien finden schließlich Trifluridin (ein Nukleosidanalogon) und Regorafenib (ein Multikinaseinhibitor) Verwendung, die jedoch wegen hoher Toxizität und vergleichsweise geringerer Effektivität kritisch bewertet werden müssen.

Trotz der Vielfalt und den Verbesserungen in der zielgerichteten Therapie versagen teilweise die oben genannten Therapien jedoch weiterhin.

Gerade in Hinblick auf *KRAS* finden sich weiterhin signifikante Therapieversager bei monoklonalen Therapienansätzen, auch bei *KRAS*-Wildtyp-Fällen, während wiederum einige KRKs trotz *KRAS*-mutiertem Status gut auf monoklonale Therapien ansprechen.

Dies zeigt, dass die vollständigen tumorbiologischen Vorgänge hinsichtlich der *KRAS*-Mutation und dessen Wechselwirkung mit anderen Tumorsignalwegen noch nicht final verstanden wurden. Dementsprechend werden weitere Untersuchungen zur Entschlüsselung der Tumorbiologie der *KRAS*-Mutation in KRK dringend benötigt.

## 1.5 Fragestellung

In dieser explorativen Studie wurde „transkriptionelles Profiling“ zur Identifizierung relevanter Gene im Zusammenhang mit der *KRAS*-Mutation genutzt. *KRAS*-mutierte und *KRAS*-Wildtyp-Fälle wurden auf ihre differentielle RNA-Expression hin überprüft, welche sich in Abhängigkeit vom *KRAS*-Genotyp differentiell exprimiert zeigten. Im Folgenden wurden dann innerhalb einer Validierungsstudie die *KRAS*-mutierten und *KRAS*-Wildtyp-Fälle mit proteinbiochemischen Methoden untersucht, um eine tumorbiologische Relevanz der gefundenen Kandidaten auf translationaler Ebene zu bestätigen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit folgende Hypothesen geprüft:

- Können die differentiell regulierten Gene auf translationaler Ebene validiert werden?
- Besteht eine Korrelation der Gene zum *KRAS*-Genotyp auf translationaler Ebene und wenn ja wie gerichtet?
- Bestehen Korrelationen der Gene zu den klinisch-pathologischen Parametern des gewählten Patientenkollektivs? Wenn ja wie gerichtet?
- Besteht eine Korrelation der ausgewählten Gene auf das Überleben der Patienten?

## 2 Material

### 2.1 Patientenkollektiv

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie wurden sämtliche Fälle mit einem KRK herausgesucht, die im Zeitraum zwischen 1995 und 2011 an einem KRK operiert worden waren.

Aus diesem Kollektiv wurde ein Test-Kollektiv (n=49) bestehend aus Großflächenschnitten zusammengestellt, welches primäre Karzinome des Colon sigmoideum, UICC-Stadien III und Mutationstypisierungen enthielt. Das unfixierte Gewebe stand hier ebenfalls zur Verfügung und wurde für 16 Fälle (8 *KRAS*-Wildtyp und 8 *KRAS*-Mutanten) zur primären Expressionsanalyse verwendet.

Zudem wurden folgende weitere klinisch-pathologische Parameter der Patienten erfasst: Geschlecht, Diagnosealter, Lokalisation, TNM-Stadien, Grading, Lymph- und Blutgefäßinvasion.

Alle Gewebeproben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Paraffinschnitte waren mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt worden. Alle KRKs waren initial von Fachärzten des Instituts begutachtet worden. Die histologischen Schnittpräparate und verfügbaren Paraffinblöcke aller Fälle wurden aus dem Archiv herausgesucht und nachmikroskopiert. Die histologische Klassifikation der Tumoren erfolgte gemäß der Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Alle Tumoren wurden nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation der *union internationale contre le cancer* (UICC) reklassifiziert [73]. Die Sterbedaten der Patienten wurden vom Epidemiologischen Krebsregister Schleswig-Holstein, Deutschland, bezogen. Sämtliche Patientendaten wurden anonymisiert. Die Verwendung des Studienkollektivs erfolgte auf der Grundlage des Ethik-Votums des UKSH, Campus Kiel (AZ 140/99). Nach Studieneinschluß wurden alle Patientendaten pseudonymisiert. Die statistischen Auswertungen erfolgten an den kumulativen Daten.

### 2.2 Antikörper

Es wurden folgende polyklonale und in Kanninchen generierte Antikörper für die Immunhistochemie verwendet: YY1AP1 in der Verdünnung 1:100, PLEKHA2 in der Verdünnung 1:100 und hnRNPA1 in der Verdünnung 1:1000 (jeweils Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Als Sekundärantikörper wurde N-Histofine Simple Stain MAX PO [MULTI], (Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan, Ref: 414154F) benutzt.

Für den Westernblot wurde als Primärantikörper YY1AP 1: 1000 in Blockierlösung verdünnt (Overexpression Lysate) und ein HRP-konjugierter-Sekundärantikörper in der Verdünnung 1: 1000 in TTBS (jeweils Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA ) benutzt.

### 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet: Paraffin (Meditate gmbH, Burgdorf, Deutschland), Xylol, 96% / 70% / 50% Ethanol und dH<sub>2</sub>O (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) sowie UltraVision Hydrogen Peroxide Block (Ref: TA-125-H202Q von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Citratpuffer (pH=6, Citronensäure + Natriumcitrat, je Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland), TBS-Puffer (pH= 7,4, Trizma base [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland] + Natriumchlorid [Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland] + A.dest.) , Proteinblock (UltraVision Protein Block, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Ref: TA-125-PBQ), Diluent (Zytomed Systems GmbH, Bargteheide, Deutschland, Ref: ZUC025-500), DAB (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA, Cat.No. SK-4100), Hämalaun (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Dr. K. Hollborn&Söhne GmbH&Co. KG, Leipzig, Deutschland, IVD: 0088663), xylollöslichen Medium (EZ-Mount, Pertex Eindeckmedium, Mediate gmbH, Burgdorf, Deutschland, Ref: 41-4011-00), PBS-Puffer (pH 7,4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), RIPA-Puffer (TRIS-HCL + NaCl + NP40 + Na-deoxycolat + SDS + doppeltdestilliertes H<sub>2</sub>O inklusive Protease-Inhibitor [je Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland]), ECL Advance Blocking Agent (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA, RPN2135), Bio-Rad DC Protein Assay Kit II (500112 EDU, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), Lämmli-Puffer (TRIS-Cl + Glycerol +  $\beta$ -Mercaptoethanol + SDS + Bromphenolblau 1% [je Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland]), 1x-Elektrophorese-Puffer (Trizma base + Glycin [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland] + SDS + A.dest.), Blottingpuffer (Trizma base + Glycin + Methanol [Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland] + A.dest.) TURBO DNA-free Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Taq-

PCR-Core-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) AGATabs Agarose (Eurogentec, Lüttich, Belgien) und Maxima Probe qPCR Master MIX (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

## 2.4 Geräte

Folgende Geräte wurden in dieser Arbeit verwendet: Paraffinstreckbad (Medite gmbH, Burgdorf, Deutschland), Mikrotom Leica RM 2245 (Leica Biosystems, Wetzler, Deutschland), Wärmeschrank (Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland), Dampfdrucktopf Pascal Model S2800 (Dako A/S, Glostrup, Dänemark), Schüttler Stuart see-saw rocker SSL 4 (Stuart Equipment, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, UK), Vortexer IKA MS 3 basic (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland), Ultraschallgerät (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland), Zentrifuge Biofuge stratos (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland), Synergy MX (Programm Lowry, BioTek, Winooski, Vermont, USA), Mini-PROTEAN (4-15% Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), ChemiDoc™ XRS+ Imaging Station (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), NanoDrop 2000c™ (), C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), LightCycler® 480 II System (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz), PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden, Deutschland).

## 2.5 Primer und Probes

Die benutzten Primer und Probes für die qualitative und quantitative PCR wurden mittels Universal Probe Library (UPL) Probes von Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz ([https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html)) designt.

## 2.6 Software

Zur statistischen Auswertung wurde PASW Statistics 20 statistical package (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet. Ansonsten fanden Microsoft® Office 2010 Home and Student (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), Windows 10 (Microsoft,

Redmont, Washington, USA) und Citavi (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz).

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Es wurden folgende Verbrauchsmaterialien genutzt: Superfrost Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Filterpapier (Whatman Papier, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), Vlies (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA), Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, RPN303D, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA), Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland), DAKOPEN (PAP PEN, Kisker Biotech GmbH&Co. KG, Steinfurt, Deutschland), Glas- und Plastikküvetten sowie Menzel-Gläser (jeweils Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Leica Bond Plus Slides Objektträger (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland), Reagenzgefäße unterschiedlicher Größe (Schott AG, Mainz, Deutschland), Mikrotom-Klinge A22 (Feather Safety Razor Co. LTD, Japan).

## 3 Methoden

### 3.1 Proteinbiochemie

#### 3.1.1 Immunhistochemie und Vorbereitung

##### 3.1.1.1 *TMA-Herstellung*

Aufgrund der hohen Fallzahl des oben genannten Studienkollektivs wurden für diese Arbeit unter anderem Tissue-Micro Arrays (TMAs) benutzt. Bei der Herstellung wurden zylinderförmige Stanzen (1,2mm) aus dem am HE-gefärbten Schnitt markierten Tumorareal des archivierten KKK Blocks entnommen und in einen neuen Trägerblock überführt.

##### 3.1.1.2 *Paraffinschnittherstellung*

Von den beschriebenen Paraffinblöcken wurden 2 µm Paraffinschnitte hergestellt, auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 64°C getrocknet. Die anschließende Lagerung erfolgte im herkömmlichen Kühlschrank bei 4°C.

##### 3.1.1.3 *Immunhistochemie*

Für die immunhistologischen Reaktionen wurden die Paraffinschnitte in Xylol (2x je 10 Minuten) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Ethanol 96%, 70%, 50% je 2 Mal 2 Minuten) und schließlich mit dH<sub>2</sub>O gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Paraffinschnitte für eine Minute in Citratpuffer und einem Dampfdrucktopf auf 125°C erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte unter Leitungswasser schrittweise abgekühlt und dann für fünf Minuten in TBS-Puffer im Schüttler gewaschen.

Zur endogenen Peroxidase-Blockierung wurde der UltraVision Hydrogen Peroxide Block auf die Schnitte getropft und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Verlaufen der nachfolgenden Substanzen zu verhindern, wurden nach der Inkubationszeit die Gewebeschnitte mit dem DAKOPEN umkreist. Es folgten drei Spülungen je 5 Minuten in TBS-Puffer.

Im nächsten Blockierungsschnitt wurde ein Proteinblock über 5 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Färbung wurden die bei dieser Arbeit verwendeten Antikörper in Diluent verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank nach einer 30-minütigen Ruhezeit bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dem Kühlschrank entnommen und nach drei weiteren Spülungen mit TBS-Puffer (je 5 Minuten) mit dem Sekundärantikörper betropft und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem verwendeten Sekundärantikörper handelt es sich um ein Peroxidasekonjugiertes Maus- und Kaninchenspezifisches-Polymersystem.

Nach einem weiteren Spülgang (3 x 5 Minuten in TBS-Puffer), wurde DAB auf die Schnitte pipettiert und je nach Antikörper 5 (YY1AP1 und PLEKHA2) oder 10 Minuten (hnRNPA1) bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Kernfärbung erfolgte nach 1-minütiger Einwirkzeit in Hämalaun und Bläuen der Schnitte unter fließendem Wasser. Abschließend führte man eine Dehydrierung der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließendem Xylolbad und Eindeckeln in einem xylollöslichen Medium durch.

#### *3.1.1.4 Beurteilung der Immunhistochemie*

Die Auswertung der Immunreaktionen erfolgte mit dem Leica-Mikroskop RM 2245, verblindet und unter Verwendung eines Immunreaktivitätsscores, der den prozentualen Anteil gefärbter Zellen und die Färbeintensität berücksichtigt:

Der Prozentanteil gefärbter Zellen wurde mit 0 (0% Zellen des Gesamttumors positiv), 1 (1-10%), 2 (11-50%), 3 (51-90%) und 4 (>90%) bewertet. Die Intensität der Immunreaktion wurden mit 0 (negativ), 1+ (schwach positiv), 2+ (mäßig positiv) und 3+ (stark positiv) bewertet. Die Addition beider Werte ergab den Immunreaktivitätsscore (IRS). Sollte die Intensität der beobachteten Immunreaktion keine Unterteilung in drei Skalierungsstufen (1+, 2+, 3+) ermöglichen, weil die Intensitätsunterschiede zu gering ausfielen, wurde die Färbeintensität nur in positiv und negativ unterschieden. Dies betraf Zytoplasma und Plasmamembran bei HNRNPA1-, Plasmamembran bei PLEKHA2- und letztlich Zytoplasma bei YY1AP1-Immunreaktionen.

#### 3.1.2 Western Blot und Vorbereitung

##### *3.1.2.1 Herstellung eines Proteinlysats aus Karzinomzelllinien*

Für die Herstellung eines Proteinlysates wurden die Zellen (hier SW480, CaCo2, HCT116 und HT29) mit PBS-Puffer gewaschen und mit RIPA-Puffer inklusive Protease-Inhibitor für 10 Minuten lysiert. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale abgeschabt, in ein sauberes



Eppendorf-Tube überführt und resuspendiert. Durch gelegentliches vortexen, während einer 10-minütigen Kühlungsphase auf Eis und der nachfolgenden Ultraschallbehandlung für 3 x 15 Sekunden wurden die Zellmembranen zertrümmert. Anschließend wurde das Lysat 15 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand mit den gewünschten Proteinen in ein neues Eppendorf-Tube überführt.

#### *3.1.2.2 Herstellung eines Proteinlysats aus Gewebe*

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe wurde Kryogewebe mit Stickstoff schockgefroren und mechanisch zertrümmert. Das pulverisierte Gewebe wurde in ein Eppendorf-Tube überführt und mit RIPA-Puffer inklusive Protease-Inhibitoren versetzt. Zur weiteren Zerkleinerung erfolgte das Aufziehen der Suspension durch die Kanüle mit einem Durchmesser von 0,7 mm. Die folgende Behandlung mit Vortexen, Kühlungsphase, Ultraschallbehandlung und Zentrifugation geschah analog zur Herstellung eines Proteinlysats aus Zellen (s.o.).

#### *3.1.2.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate*

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay Kit II bestimmt. Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (1-7, Endkonzentration von 5 µg/µl bis 0,125 µg/µl) mit BSA hergestellt, um eine Standardkurve zu ermitteln. Jeweils 5 µl der zu vermessenden Probe, Standardreihe und Blank wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit je 25 µl der Reagenz A+ S und je 200 µl Reagenz B vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (800 Umdrehungen pro Minute) erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm am Synergy MX und die Berechnung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve.

#### *3.1.2.4 SDS-Page*

Zunächst wurden 20 µg Proteinlysate mit 2-fach konzentrierten Lämmli-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde das Lysat auf ein 4-15% Tris-Glycin aufgetragen und in eine Mini-PROTEAN 4-15% Elektrophoresekammer gefüllt, welche mit 1x-Elektrophorese-Puffer versetzt und für 30 Minuten bei 200 V aufgetrennt wurde.

#### *3.1.2.5 Western Blot*

Es folgte die Lösung des Gels aus der Elektrophorese-Vorrichtung, eine dH<sub>2</sub>O-Spülung und 10-minütige Equilibrierung in Blotting-Puffer. Filterpapier, Vlies und die Nitrocellulose-

Membran equilibrierten für 30 Minuten in Blottingpuffer. In die Blothalterung wurde in folgender Reihenfolge ein feuchtes Vlies, darauf Filterpapier, Gel, eine Nitrocellulose-Membran, Filterpapier und wiederum ein Vlies gelegt und anschließend fixiert. Nach Einhängen des Eisakkus, der Blothalterung und Zugabe eines Magnetrührstäbchens wurde die Elektrophoresekammer mit Blottingpuffer befüllt, auf einen Magnetrührer zur Kälteverteilung gestellt und die Proteinübertragung (Blotten) von Gel auf Membran für 60 Minuten bei 100 V durchgeführt.

#### *3.1.2.6 Proteindetektion*

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 2% Blockierlösung, bestehend aus 1 g ECL Advance Blocking Agent über 15 Minuten in 50 ml TBS-Tween aufgelöst, geschwenkt. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper YY1AP (1: 1000 in Blockierlösung verdünnt). Nach dreimaliger Spülung mit TTBS folgte im Anschluss die Inkubation mit dem HRP-konjugierten-Sekundärantikörper (1: 1000 in TTBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Spülvorgang mit dreimaligem TTBS-Pufferwechsel wurde die Membran in der, gemäß Herstellerangaben angesetzten Entwicklerlösung, für 30 Sekunden inkubiert. Die Proteinvisualisierung erfolgte über den ChemiDoc™ XRS+ Imaging Station.

## 3.2 Molekularbiologie (YY1AP1)

### 3.2.1 RNA-Isolation

Für den nachfolgenden DNase-Verdau und die cDNA-Synthese wurden RNA-Proben aus einem vorigen Projekt von Dr. rer. nat. Ann-Kathrin Wenke verwendet. Diese RNA wurde isoliert und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben wurde das NanoDrop 2000c™ und die dazugehörige Software verwendet. Dazu wurden 2 µl RNA auf die Messoberfläche pipettiert und gegen eine Referenzlösung, hier Nuklease-freies Wasser, gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A260). Für die RNA wurden Werte um 2,0 angestrebt.

### 3.2.3 DNase-Verdau

Um eine Kontamination der RNA durch genomische DNA aufzuheben, wurde ein DNase-Verdau mit dem TURBO DNA-free Kit durchgeführt. Für jeden Ansatz wurde 1 µg RNA mit 1,65 µl 10x TURBO DNase Puffer und 1 µl TURBO DNase vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jedem Ansatz 2 µl DNase Inactivation Reagent zugegeben und für weitere 5 Minuten bei 25°C unter gelegentlichem Vermischen inkubiert. Die Sedimentation des Stop-Reagenz erfolgte abschließend mit einer Zentrifugation des Ansatzes bei 10,000x g für 1,5 Minuten. Der dekontaminierte, RNA-haltige Überstand wurde abschließend in ein neues Gefäß überführt und erneut photometrisch überprüft.

### 3.2.4 cDNA-Synthese

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA aus den zuvor DNase-verdauten RNA-Templates wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR benutzt. Zunächst wurden 4 µl 5xReaction Mix und 2 µl Maxima Enzyme Mix mit 1 µg RNA-Template vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mittels Vortexer vermischt und herabzentrifugiert. Im 5xReaction Mix sind ein Reaktionspuffer, dNTPs, Oligo(dT)18 - sowie random Hexamer Primer enthalten. Zur Kontrolle eventuell verbliebener DNA-Kontaminationen wurde parallel in einem Ansatz auf die Zugabe der Reversen Transkriptase verzichtet (negRT). Um eine potenzielle Reagenzkontamination zu detektieren, wurde zudem eine NTC verwendet. Die Transkription erfolgte schließlich im Thermocycler. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 25°C, danach folgte die Reverse Transkription innerhalb von 30 Minuten bei 50°C. Die Termination der Synthese erfolgte über eine 5-minütige Erhitzung auf 85 °C, bei der alle enthaltenen Enzyme inaktiviert wurden. Die Lagerung der cDNA erfolgte anschließend bei -20°C.

### 3.2.5 Qualitative PCR

Zur Etablierung der humanen Primer für die spätere quantitative Real Time PCR, sowie zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA-Synthese wurde die PCR verwendet. Es wurden spezifische Primer für YY1AP1 und GON4L mit dem Online Programm der Universal Probe Library design (siehe **Tabelle 3**). Die Durchführung der qualitativen PCR fand mittels Taq-PCR-Core-Kit statt. Für einen Reaktionsansatz von 25 µl Volumen wurden 2,5 µl 10x PCR Puffer, 1,25 µl dNTPs (je 2mM), je 1 µl 10 µM forward und reverse Primer 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/ µl) mit Nuklease-freiem Wasser vermischt. Zuletzt wurde 1 µl des cDNA-Templates hinzugefügt und abermals durchmischt. Die Testung der optimalen Annealing-

Temperatur der jeweiligen Primer erfolgte mithilfe einer Gradienten-PCR. 10 µl des PCR-Produkts wurden auf einem 2%-igen Agarosegel (AGATabs + Na<sub>2</sub>EDTA + Essigsäure + Aqua dest.) aufgetragen und bewertet.

**Tabelle 3: Primer-Eigenschaften für qualitative und quantitative Real-Time-PCR**

	Fw Primer (5'→ 3')	Rev Primer (5'→ 3')	Länge (bp)	NCBI Ref_Sequenz	Sonde
YY1AP1	Gggtacttaaaccagatttg	cagagtgggagcaggctaaa	68	NM_001198899.1	45
GON4L	Caaatgaacacgtgtagctatg	gagcgtgtcatttagctca	84	NM_001282856.1	46
HPRT1	tgacctgattatttgcatacc	cgagcaagacgttcagtct	102	NM_000194.2	73
TFRC	acctgtccagacaatctccag	tgtttccagtcagaggaca	82	NM_003234.2	12
PBGD1	tgtggtggaaccagctc	Tgttgaggtttcccgaat	92	NM_000190.3	26

### 3.2.6 Quantitative RT-PCR

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression wurde das auf PCR basierende LightCycler ® 480 II System mit 96-Well-Format, der Maxima Probe qPCR Master MIX (2X) und die Universal Probe Library Probes benutzt.

Zuerst wurde für die Messungen am Light Cycler 480 System pro Gen ein Mastermix (20 µl) hergestellt. Dazu wurden 12,5 µl 2xProbe Master, 0,25 µl UPL Probe (100 nM), je 0,5 µl Forward und Reverse Primer (10 µM) mit 6,25 µl Nuklease-freiem Wasser in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Anschließend wurden für *YY1AP1*, *GON4L* und die drei Haushaltsgene (*HPRT1*, *TFRC*, *PBGD*) 20 µl des Mixes für die 12 Patientenproben, sowie eine Referenz-DNA, negRT und NTC jeweils in Duplikaten in die 96-well-Platte pipettiert. Schließlich wurden 5 µl der zuvor verdünnten cDNA-Templates (1:50) Layout-entsprechend hinzugefügt. Zur Expressionsanalyse wurde ein Hot Start PCR-Programm gewählt, bei dem eine einmalige 10-minütige Denaturierung bei 95°C stattfand, gefolgt von 55 Replikationszyklen bestehend aus: 15 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 60°C und 30 s Elongation bei 72°C und schlussendlicher Kühlung und Schmelzpunktanalyse.

### 3.2.7 Relative Quantifizierung

Zunächst wurde für die Auswertung der qRT-PCR eine Effizienzbestimmung durchgeführt. Zur Berechnung der Effizienz wurde eine Standardkurve erstellt, in der die Ct-Werte einer vierstufigen Verdünnungsreihe (1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000) aus einer kommerziellen cDNA jeweils in Triplikaten für *YY1AP1*, *GON4L* und die drei Haushaltsgene generiert wurden. Aus der Steigung der jeweiligen Kurven wurde die Effizienz mit folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} \quad [56]$$

Die real vorliegenden Effizienzen wurden hinterlegt und in die Quantifizierung mit einbezogen.

Im nächsten Schritt wurde in der Auswertungssoftware des Light Cycler 480 der Programmpunkt „Relative Quantifizierung“ ausgewählt, wodurch eine Normalisierung unserer Zielgene gegen die drei verwendeten Haushaltsgene *PBGD*, *TFRC* und *HPRT1* erfolgte.

### 3.3 *KRAS*-Mutationsanalyse

Drei Fälle der immunhistochemisch gefärbten *YY1AP1*-Kohorte wurden für eine Mutationsanalyse ausgewählt. Alle zeigten einen hohen Anteil an Tumorgewebe und eine intensive Membranfärbung für *YY1AP1/GON4L* in gut abgrenzbaren Tumorebenen. Diese Areale wurden auf den mit einem gegen *YY1AP1*-gerichteten Antikörper gefärbten Schnitten markiert. Die frisch präparierten Folgeschnitte (Serienschnitte) wurden entparaffiniert und makrodisseziert, um tumorzellreiche Proben (Tumorzellanteil >80%) zu erhalten.

Anschließend wurde die genomische DNA mit dem QIAamp DNA mini kit nach Herstellerangaben extrahiert. Die Mutationanalyse von Codon 12 und 13 des *KRAS*-Gens erfolgte durch Pyrosequenzierung.[84] Dazu wurden die folgenden Primer verwendet: vorwärts 5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' und rückwärts 5'-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3' (*KRAS*, codon 12/13). Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem PyroMark Q24 und folgende Primer sequenziert: 5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3' (*KRAS*, Kodon 12/13). Die *KRAS*-Genotypisierung wurde durch ein extern durchgeführtes Qualitätssicherungsprogramm der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und dem *Bundesverband Deutscher Pathologen e.V.* ([www.dpg-berlin.de](http://www.dpg-berlin.de); date of accession 24<sup>th</sup> August 2010) zertifiziert.

### 3.4 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm PASW Statistics 20 statistical package verwendet. Zum Vergleichen von verschiedenen Gruppen wurden bei nominalen Variablen der Fishers Exact Test und bei ordinalen Variablen Kendalls Tau zur Rangerstellung benutzt. Univariate Überlebensfunktionen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und die multivariate Überlebensanalyse mit der Cox-Regressions-Methode. Die quantitativen RT-PCR Daten wurden logarithmiert, um annähernd normal verteilte Daten zu erhalten, und mit dem gepaarten- sowie einem unabhängigen-Proben T-Test evaluiert. Multiples testing wurde nach der Bonferroni-Methode durchgeführt. P-Werte  $<0.05$  wurden als statistisch signifikant und  $p<0.01$  als hoch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

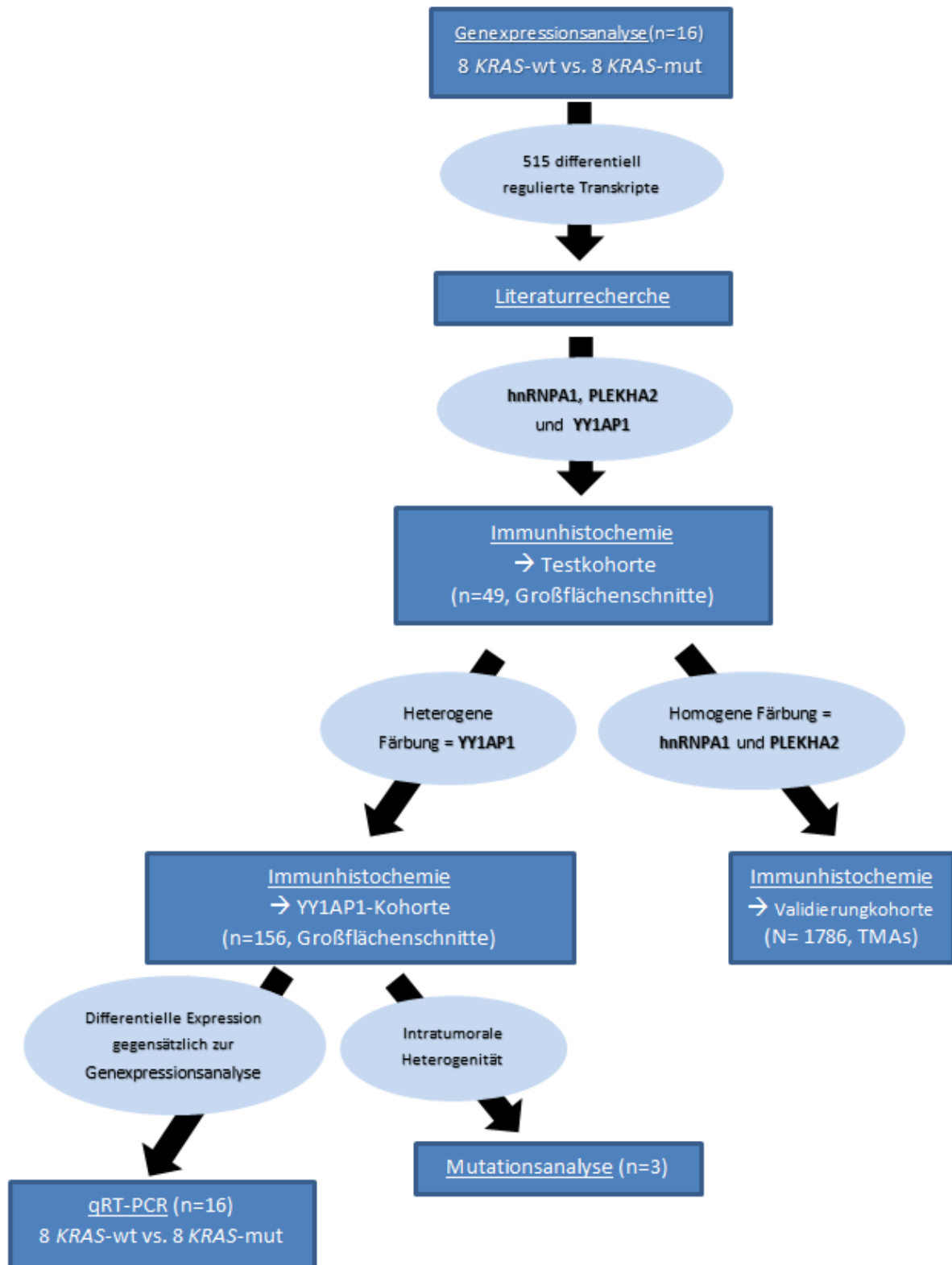


Abbildung 3: Grafische Darstellung des Studiendesigns

#### 4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die vollständigen klinisch-pathologischen Daten der zu untersuchenden Kohorten sind in **Tabelle 4** zusammengefasst. Das Studienkollektiv umfasst 1594 Patienten [781 (49,0%) Frauen; 813 (51,0%) Männer] und 1786 Proben. Hierbei waren 192 Proben mehrfach einem Patienten zugeordnet. Daher wurden bei den Auswertungen bezüglich Geschlecht, Alter, UICC-, L-, V-, N- und M-Stadium nur die Proben verwendet die einem Individuum sicher zugeordnet werden konnten, während bei den restlichen probenbezogenen Parametern (Lokalisation, T-Stadium, Grading und *KRAS*-Mutation) alle Proben ausgewertet wurden. Das mediane Patientenalter betrug 71 Jahre bei einem Wertebereich von 26 - 98 Jahren. Aus dem Gesamtkollektiv wurden ein Testkollektiv gebildet (n=49, Großflächenschnitte, Colon sigmoideum, UICC-Stadien III und *KRAS*-mutationstypisiert), eine YY1AP1-Studienkohorte (n=156 Patienten mit Großflächenschnitten) und eine PLEKHA2-/hnRNPA1-Kohorte (n= 1786 Patienten).

Für die Gene Chip - Analysen und die qRT-PCR wurden gepaarte neoplastische und nicht-neoplastische Gewebeproben von 8 *KRAS*-Wildtyp und 8 *KRAS*-mutierten KRKs Patienten des Testkollektivs verwendet (Colon sigmoideum, UICC Stadium III, Geschlechtsverhältnis 1:1, medianes Alter 60.5 Jahre; Altersumfang 36 bis 83 Jahre).

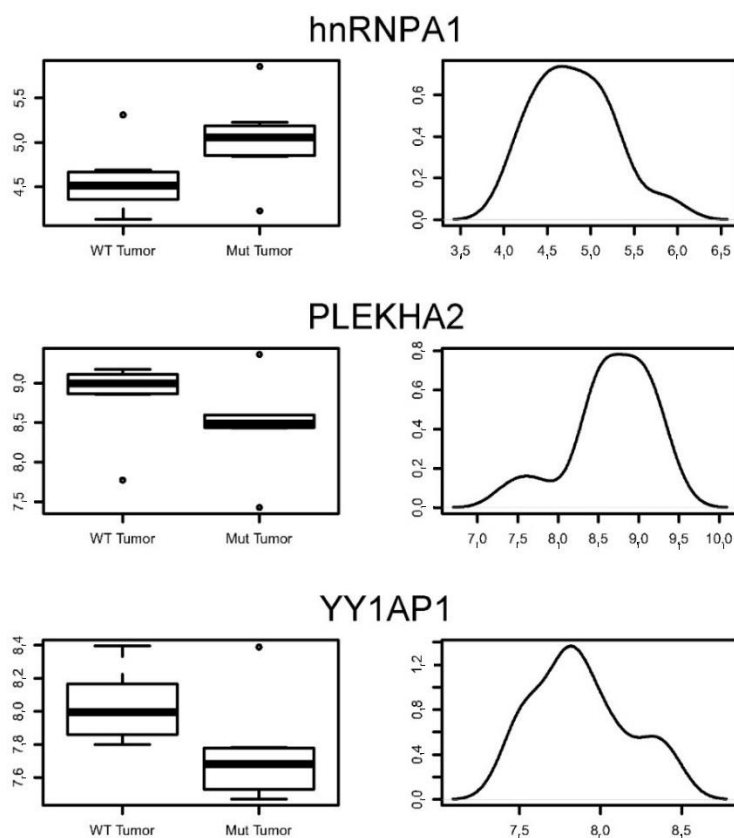


**Tabelle 4: Charakterisierung des Patientenkollektivs**

Klinisch-pathologische Parameter		Testkohorte (Großflächenschnitte)		Validierungskohorte			
				YY1AP1 (Großflächenschnitte)		PLEKHA2/hnRNPA1 (TMA)	
<b>Geschlecht</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
weiblich	<i>n</i> (%)	21	(43,8)	21	(43,8)	781	(49,0)
männlich	<i>n</i> (%)	27	(56,3)	27	(56,3)	813	(51,0)
<b>Diagnosealter</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
Median (Wertebereich)	<i>n</i>	69,5	36.0-83.0	69,5	36.0-83.0	71,0	26.0-98.0
<71 Jahre	<i>n</i> (%)	25	(52,1)	25	(52,1)	778	(48,8)
≥71 Jahre	<i>n</i> (%)	23	(47,9)	23	(47,9)	816	(51,2)
<b>KRAS Status</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>49/</b>	<b>0</b>	<b>156</b>	<b>0</b>	<b>157/</b>	<b>1629</b>
Wildtyp	<i>n</i> (%)	30	(61,2)	91	(58,3)	91	(58,0)
Mutation	<i>n</i> (%)	19	(38,8)	65	(41,7)	66	(42,0)
<b>Lokalisation</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>49/</b>	<b>0</b>	<b>140/</b>	<b>16</b>	<b>1674/</b>	<b>112</b>
Appendix	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	1	(0,7)	1	(0,1)
Ceacum	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	17	(12,1)	286	(17,1)
Colon ascendens	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	17	(12,1)	271	(16,2)
Rechte Flexur	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	13	(0,8)
Colon transversum	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	5	(3,6)	86	(5,1)
Linke Flexur	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	2	(1,4)	39	(2,3)
Colon descendens	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	5	(3,6)	50	(3,0)
Colon sigmoideum	<i>n</i> (%)	46	(93,9)	70	(50,0)	474	(28,3)
Colon sigmoideum/Rektum	<i>n</i> (%)	3	(6,1)	7	(5,0)	82	(4,9)
Rektum	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	16	(11,4)	372	(22,2)
<b>T-Kategorie</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>49/</b>	<b>0</b>	<b>153/</b>	<b>3</b>	<b>1782/</b>	<b>4</b>
T1	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	11	(7,2)	89	(5,0)
T2	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	32	(20,9)	387	(21,7)
T3	<i>n</i> (%)	49	(100,0)	91	(59,5)	1010	(56,7)
T4a	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	14	(9,2)	205	(11,5)
T4b	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	5	(3,3)	91	(5,1)
<b>N-Kategorie</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1576/</b>	<b>210</b>
N0	<i>n</i> (%)	26	(54,2)	26	(54,2)	877	(55,6)
N1a	<i>n</i> (%)	2	(4,2)	2	(4,2)	152	(9,6)
N1b	<i>n</i> (%)	8	(16,7)	8	(16,7)	180	(11,4)
N1c	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	3	(0,2)
N2a	<i>n</i> (%)	8	(16,7)	8	(16,7)	165	(10,5)
N2b	<i>n</i> (%)	4	(8,3)	4	(8,3)	199	(12,6)
<b>Stadium (8<sup>th</sup> ed.)</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
I	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	327	(20,5)
IIA	<i>n</i> (%)	24	(50,0)	24	(50,0)	461	(28,9)
IIB	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	40	(2,5)
IIC	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	27	(1,7)
IIIA	<i>n</i> (%)	0	(0,0)	0	(0,0)	46	(2,9)
IIIB	<i>n</i> (%)	13	(27,1)	13	(27,1)	325	(20,4)
IIIC	<i>n</i> (%)	1	(2,1)	1	(2,1)	181	(11,4)
IVA	<i>n</i> (%)	8	(16,7)	8	(16,7)	123	(7,7)
IVB	<i>n</i> (%)	2	(4,2)	2	(4,2)	64	(4,0)
<b>Grading</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>49</b>	<b>0</b>	<b>147/</b>	<b>9</b>	<b>1744/</b>	<b>42</b>
G1	<i>n</i> (%)	5	(10,2)	11	(7,5)	57	(3,3)
G2	<i>n</i> (%)	41	(83,7)	113	(76,9)	1366	(78,3)
G3	<i>n</i> (%)	3	(6,1)	23	(15,6)	321	(18,4)
<b>Lymphatische Invasion</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
L0	<i>n</i> (%)	41	(85,4)	41	(85,4)	1202	(75,4)
L1	<i>n</i> (%)	7	(14,6)	7	(14,6)	392	(24,6)
<b>Gefäßinvasion</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
V0	<i>n</i> (%)	47	(97,9)	47	(97,9)	1483	(93,0)
V1	<i>n</i> (%)	1	(2,1)	1	(2,1)	111	(7,0)
<b>M</b>	<i>n</i> valide/fehlend	<b>48/</b>	<b>1</b>	<b>48/</b>	<b>108</b>	<b>1594/</b>	<b>192</b>
M1	<i>n</i> (%)	10	(20,8)	10	(20,8)	188	(11,8)
MX	<i>n</i> (%)	38	(79,2)	38	(79,2)	1406	(88,2)

## 4.2 Genexpressionsanalyse kolorektaler Karzinom mit und ohne *KRAS*-Mutation

In einer Vorarbeit von Frau Dr. rer. nat. A. Wenke (BMBF-gefördertes Studienprojekt des Instituts für Pathologie; ColoNET) wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen *KRAS*-mutierten und *KRAS*-Wildtyp Tumoren mit Hilfe von Genearrays untersucht. Von 16 primären KRKs (8 *KRAS*-Wildtyp und 8 *KRAS*-mutierte) wurde mRNA aus dem Primärtumor und der nichtneoplastischen Dickdarmschleimhaut extrahiert und einzeln mittels Affymetrix Human Gene 1.1 ST GeneChips® untersucht. Es fanden sich 172 signifikant hochregulierte und 303 runterregulierte Transkripte, die mindestens eine 1,5 log-fache Differenz zwischen *KRAS*-mutierten und -Wildtyp KRKs aufwiesen. Zudem fanden sich 48 Transkripte mit bimodalen Verteilungsmuster der Expression innerhalb der *KRAS*-mutierten und -Wildtyp-Fälle, die keine Überlappungen bis auf Ausreißer zeigten (**Abbildung 4** zeigt die bimodale Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten Gene).



**Abbildung 4: Bimodale Verteilung der ausgewählten Gene.** Die Boxplots zeigen für *hnRNPA1* eine erhöhte Expression bei der *KRAS*-Mutation, während sich für *PLEKHA2* und *YY1AP1* eine geringe Expression zeigt. (Grafik erstellt durch Sergio Grimbs, Potsdam).

### 4.3 Literaturrecherche

Zur Identifikation tumorbiologisch relevanter Gene hinsichtlich der *KRAS*-Mutation im KRK wurde zunächst die Gruppe der bimodal verteilten Transkripte mittels Literaturrecherche via Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) überprüft. Hierbei fielen drei Gene auf: *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1*.

*hnRNPA1* (Gene ID: 3178) gehört zu der A/B Subfamilie der ubiquitär exprimierten *heterogenous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) und scheint unter anderem in der Regulation der Genexpression, des Signalings und der Tumorgenese involviert zu sein [14]. Interessanterweise scheint rekombinantes *hnRNPA1* mit der G-Quadruplex Struktur des *KRAS*-Promoters zu interagieren [86], weshalb es als Kandidat für weiterführende Untersuchungen besonders interessant erschien.

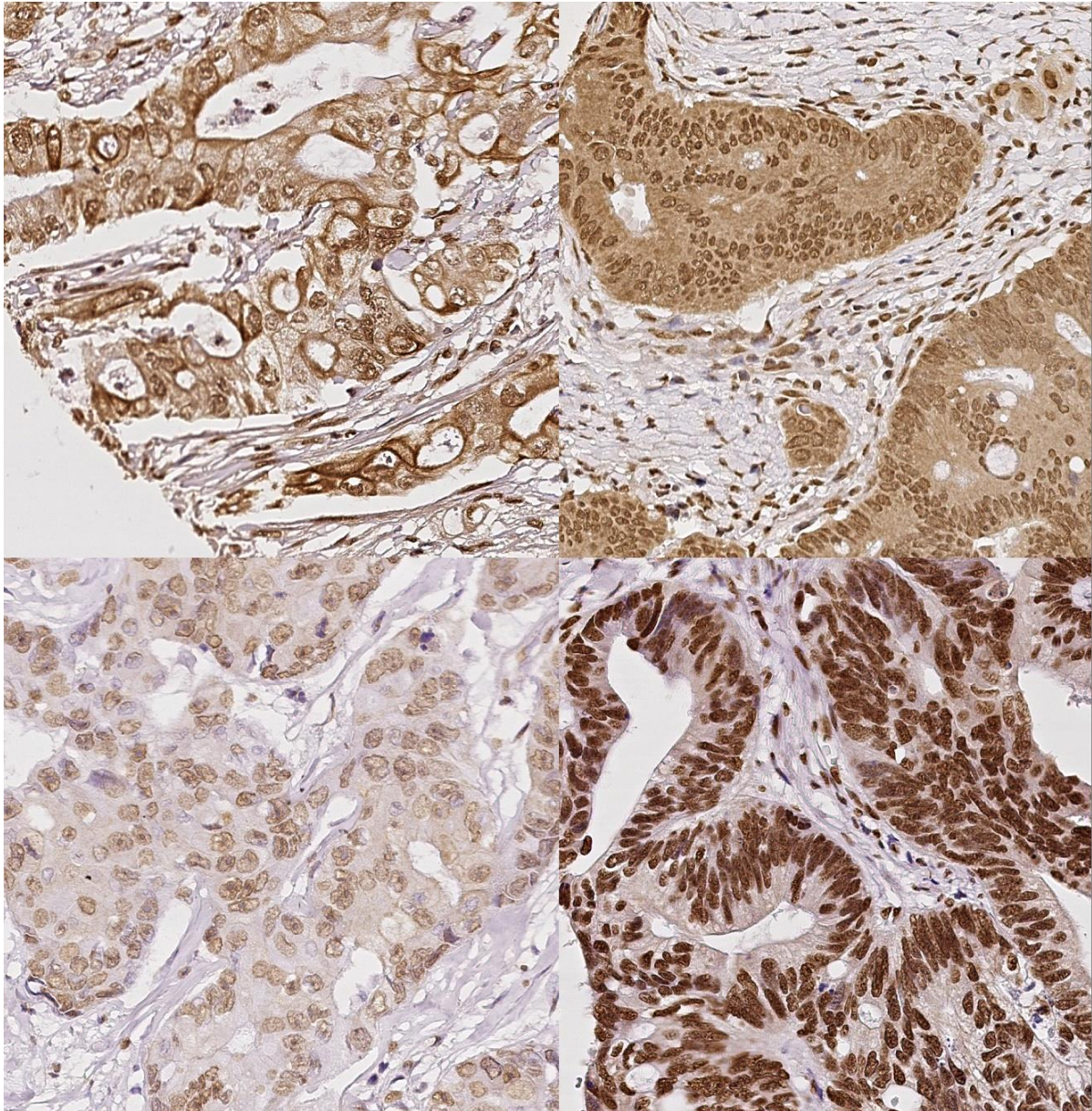
*PLEKHA2* (*Pleckstrin homology domain containing A2*; Gene ID: 59339) kodiert für ein Protein des PI3K-Signalweges.[22] PI3K ist ein Mitglied des Ras/PI3K/PTEN/Akt-Signalweges, der eine wichtige Rolle in Proliferation und Tumorgenese einnimmt.[55]

*YY1AP1* (YY1 associated protein 1; Gene ID: 55249) wird ubiquitär exprimiert. Es ist möglicherweise ein Koaktivator von YY1, einem Zinkfinger-Transkriptions-Faktor, der vermutlich Onkogene wie *c-myc* and *p53* aktivieren kann [34, 82].

### 4.4 Translationale Expression von *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1* in kolorektalen Karzinomen

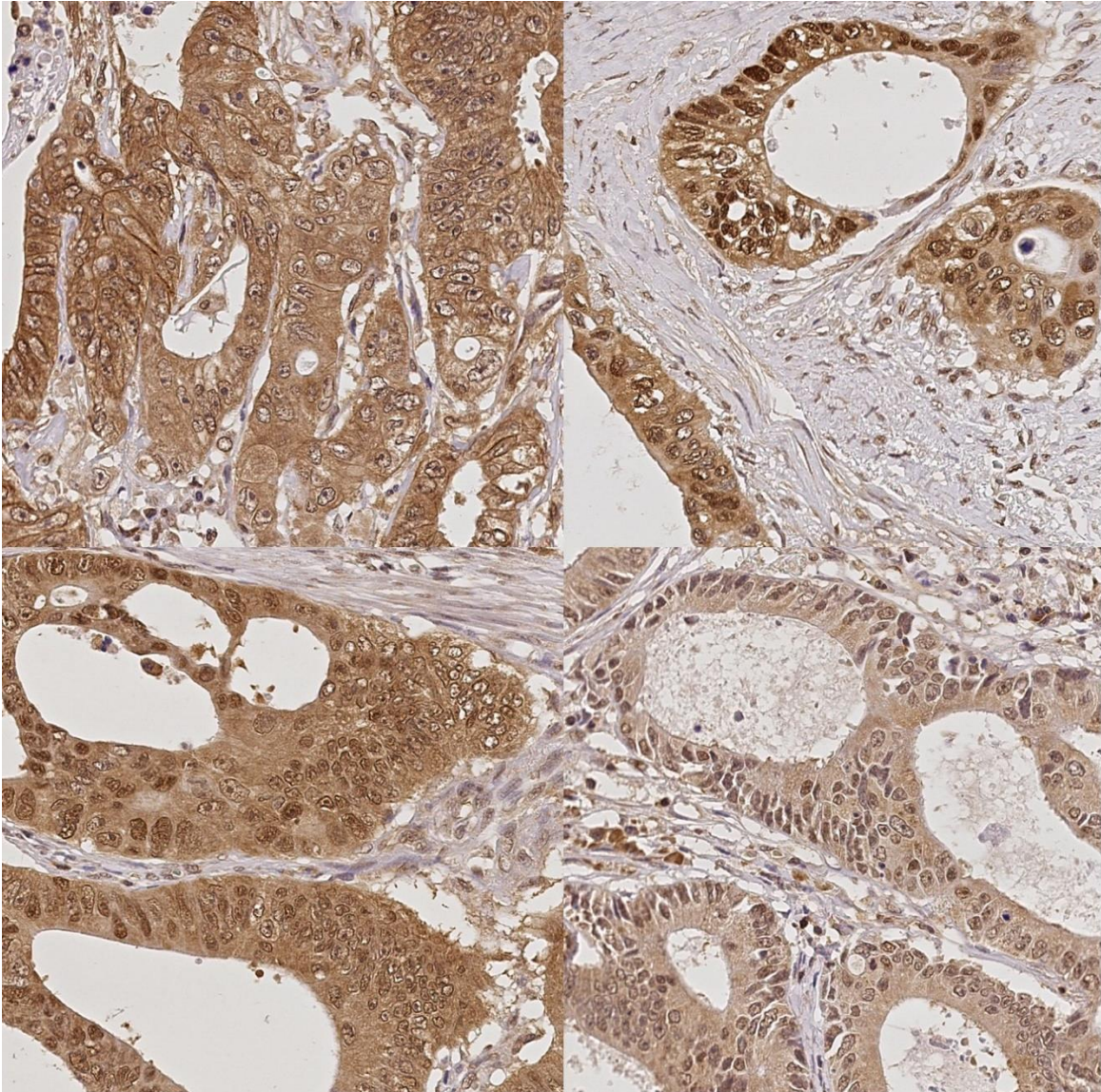
Im nächsten Schritt wurde die translationale Expression von *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1* mittels Immunhistochemie an 49 KRKs untersucht. Dieses Testkollektiv beinhaltete die 16 Patienten der Gene Array-Analyse und und 33 zusätzliche KRKs mit bekanntem *KRAS*-Genotyp. Es wurden Großflächenschnitte verwendet, um eine heterogene Proteinexpression identifizieren zu können.

HnRNPA1 zeigte ein homogenes Färbemuster der Nuclei, des Zytoplasmas und teilweise der Plasmamembran in Tumorzellen (**Abbildung 5**). Im nicht-neoplastischen Gewebe fand sich *hnRNPA1* in Endothelzellen und Kryptenepithelien, sowie im peripheren Nervengewebe, Ganglien, Lymphozyten und glatten Muskelzellen.



**Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von hnRNPA1.** Es zeigten sich verschiedenartige Färbemuster innerhalb kolorektaler Karzinome wie die hier abgebildete starke Plasmamembranfärbung (A), schwache bis moderate cytoplasmatische Färbung (A und B) und eine schwache (A und C) sowie starke (B und D) nukleäre Immunreaktion. Färbung mit anti-hnRNPA1-Antikörper, Hämalaun gegengefärbt, 400-fache Vergrößerung.

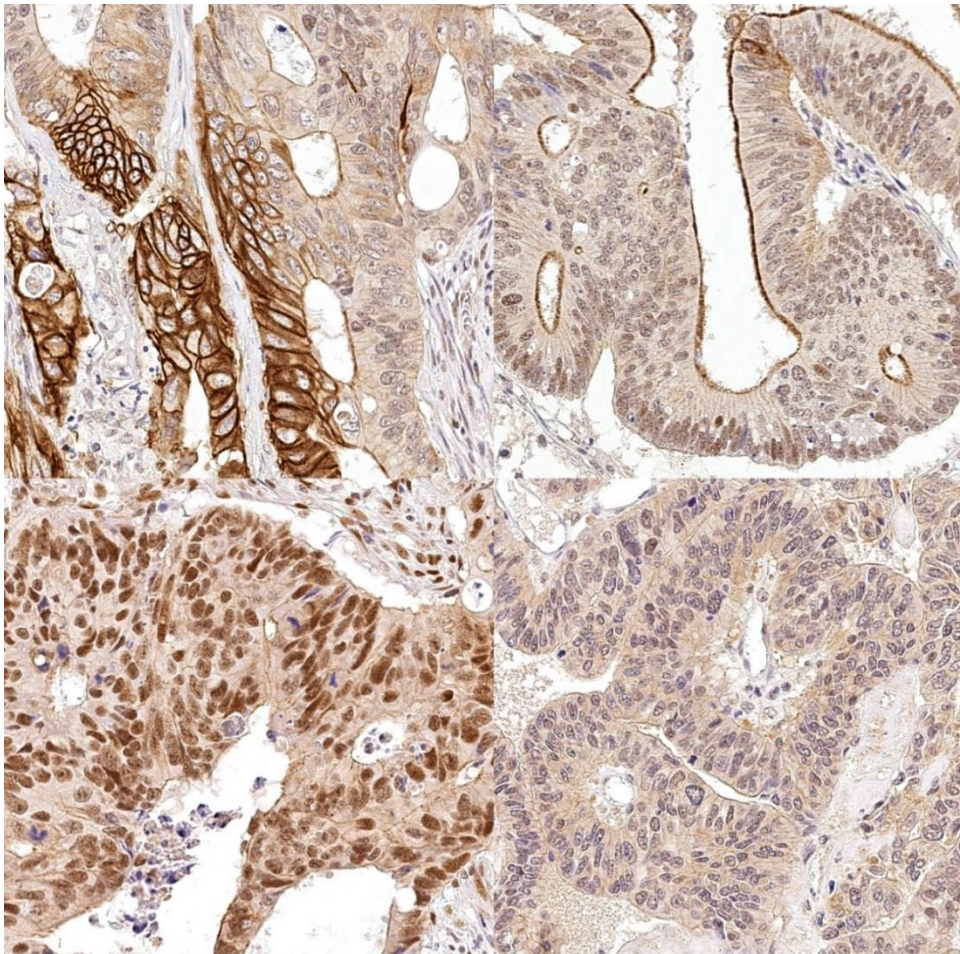
PLEKHA2 wies ein homogenes Expressionsmuster in den Kernen, dem Zytoplasma und selten an der Plasmamembran in Tumorzellen auf (**Abbildung 6**). Endothelzellen färbten sich schwach im Nukleus und im Zytoplasma. Kryptenepithelien, Lymphozyten und Granulozyten zeigten eine moderate Expression im Kern und Kryptenepithelien zusätzlich noch im Zytoplasma. Peripheres Nervengewebe, Ganglien und glatte Muskelzellen zeigten nur eine schwache Färbung im Kern.



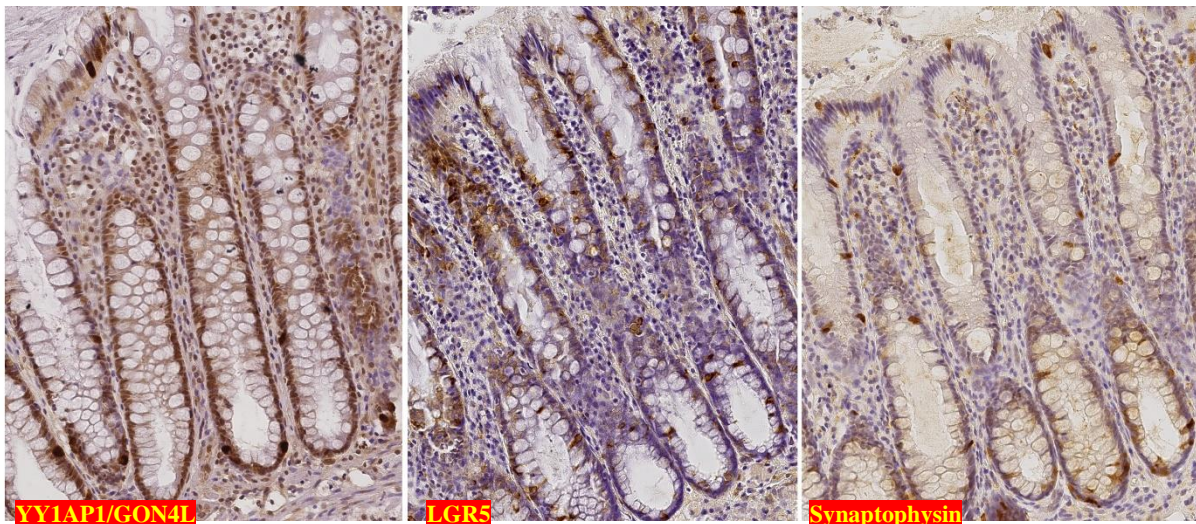
**Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung von PLEKHA2.** PLEKHA2 war in den unterschiedlichen zellulären Kompartimenten in variablen Intensitäten exprimiert. Beispielsweise zeigte sich teilweise eine membranäre Immunreaktion (A; hier ein KRAS-mutierter Tumor), sowie eine zytoplasmatische Immunreaktion (A - C stark und D schwach) und nukleäre Färbungen (B - D). Anti-PLEKHA2-Antikörper, Hämalaun gegengefärbt, 400-fache Vergrößerung.

Die Literaturrecherche hatte ergeben, dass *YY1AP1* mit *GON4L* einen Paralog besitzt, der zu circa 88% auf Proteinebene mit *YY1AP1* übereinstimmt.[62] Daraus ergibt sich in den immunhistochemischen Reaktionen das Risiko eines zusätzlichen Nachweises von *GON4L*: zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Experimente war ein hoch spezifischer, ausschließlich gegen *YY1AP1* gerichteter Antikörper ohne potentielle Kreuzreaktion mit *GON4L*, nicht erhältlich. Aus diesem Grunde wird die Immunreaktion nachfolgend mit *YY1AP1/GON4L* beschrieben. Im Gegensatz zu den beiden vorher untersuchten Antigenen zeigte *YY1AP1/GON4L* ein heterogenes Muster der Immunreaktion. In den Tumorzellen wurde

YY1AP1/GON4L im Kern, im Zytoplasma und besonders auffällig an der Plasmamembran exprimiert. Letzteres konnte weiterhin in eine apikale und basolaterale Plasmamembranfärbung unterteilt werden (**Abbildung 7**). Eine schwache nukleäre Färbung konnte im nicht-neoplastischen Kolongewebe der Kryptenepithelien, in peripheren Nervenzellen, Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Endokrine Zellen zeigten interessanterweise eine äußerst starke Immunreaktion (**Abbildung 8 mit LGR5 und Syn**).



**Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von YY1AP1/GON4L.** Der hier verwendete anti-YY1AP1-Antikörper kreuzreagiert wahrscheinlich mit dem Paralog GON4L (s. S 22 und Abbildung 7). Es zeigten sich verschiedene heterogene Immunreaktionen wie starke basolaterale bis zirkumferentielle Plasmamembranfärbungen (KRAS-mutierter Tumor; A), apikale Plasmamembranfärbungen (KRAS-mutierter Tumor; B), nukleäre Färbungen (KRAS-Wildtyp Tumor; C) und zytoplasmatische Färbungen (KRAS-Wildtyp; D). A verdeutlicht die heterogene Expression von YY1AP1/GON4L, welche die Nutzung von TMAs verbot. Anti-YY1AP1-Antikörper, Hämalaun-Gegenfärbung, 400-fache Vergrößerung.



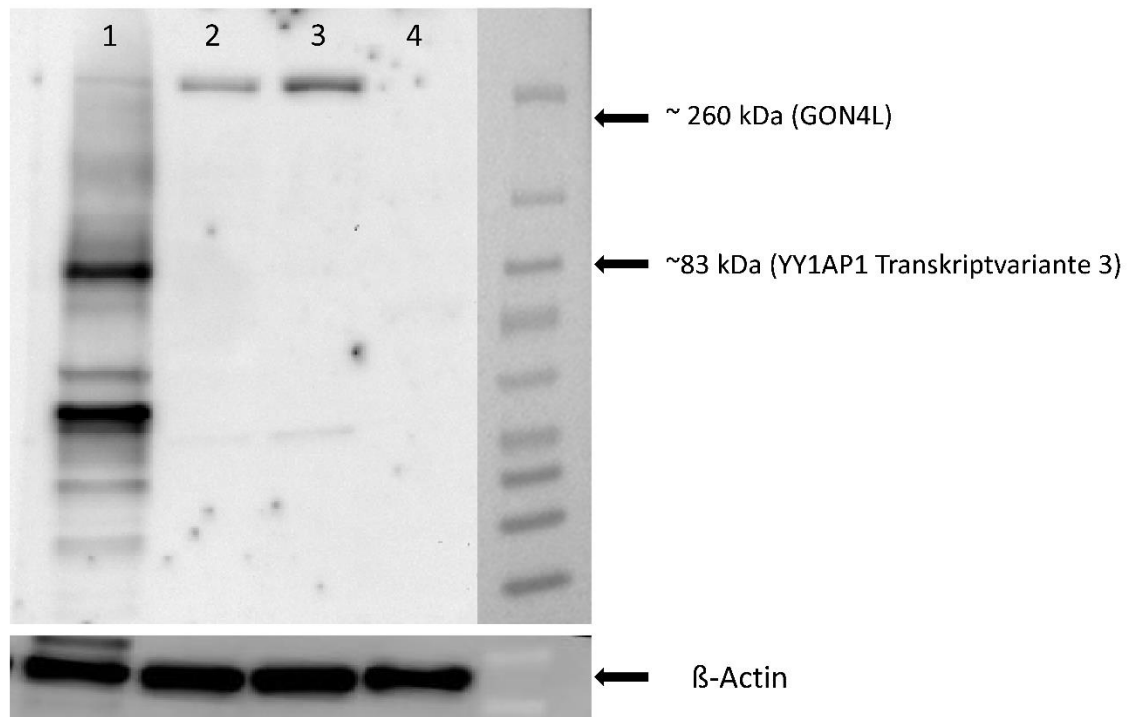
**Abbildung 8: Immunhistochemische Vergleichsfärbung zwischen YY1AP1/GON4L, LGR5 und Synaptophysin.** Der Vergleich zeigt nicht-neoplastisches Gewebe eines Kolons, bei denen sich bei der anti-YY1AP1/GON4L-Immunreaktion intensiv gefärbte basale Epithelzellen zeigten. Im Vergleich dazu wurde zur Identifikation des Zelltyps ein Stammzellmarker (LGR5) und ein Marker für endokrine Zellen (Synaptophysin) an Serienschnitten gefärbt. Beide Zelltypen zeigen sich morphologisch ebenfalls als basal verteilte Zellen. Die willkürliche Verteilung der basalen Zellen in der YY1AP1/GON4L-Färbung ähnelt dem Verteilungstyp der Synaptophysin-immunreaktiven Zellen, sodass es sich hier nächstliegend um endokrine Zellen handelt. Anti-YY1AP1-Antikörper, anti-LGR-5-Antikörper und anti-Synaptophysin-Antikörper, Hämalaun-Gegenfärbung, 200-fache Vergrößerung.

Zusammengenommen bestätigen die immunhistochemischen Untersuchungen die translationale Expression von *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1/GON4L* im KRK. Um die mutmaßliche tumorbiologische Relevanz von *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1/GON4L* im KRK zu überprüfen, wurden die Kollektive erweitert und erneut immunhistochemisch untersucht.

#### 4.5 Testung der anti-YY1AP1-Spezifität und Evaluation der YY1AP1-Expression in unterschiedlichen KRK-Genotypen im Western Blot

Der anti-YY1AP1-Antikörper wurde im Western Blot hinsichtlich seiner Spezifität studiert. Weiterhin wurde die YY1AP1-Expression in unterschiedlichen Zelllinien mit divergierenden *KRAS*-Genotypen, sowie an Gewebeproben von unterschiedlichen KRKs untersucht. Zunächst wurde der anti-YY1AP1-Antikörper an einer Positivkontrolle (ein Überexpressionslysat von YY1AP1) und an einer Negativkontrolle (Leervektor-transfizierte-HEK-Zellen) getestet. Hier weist das Ergebnis auf eine wie erwartet gute Bindung des Antikörpers an YY1AP1 nach (**Abbildung 9**; Bande in Spur 1 bei 83 kDa wahrscheinlich YY1AP1 Transkriptvariante 3). Allerdings findet sich auch der Hinweis auf eine weitere Bande (**Abbildung 9**; Bande in Spur 1 bei circa 260kDa). Bei dieser könnte es sich anhand der Größe um GON4L handeln. Um die

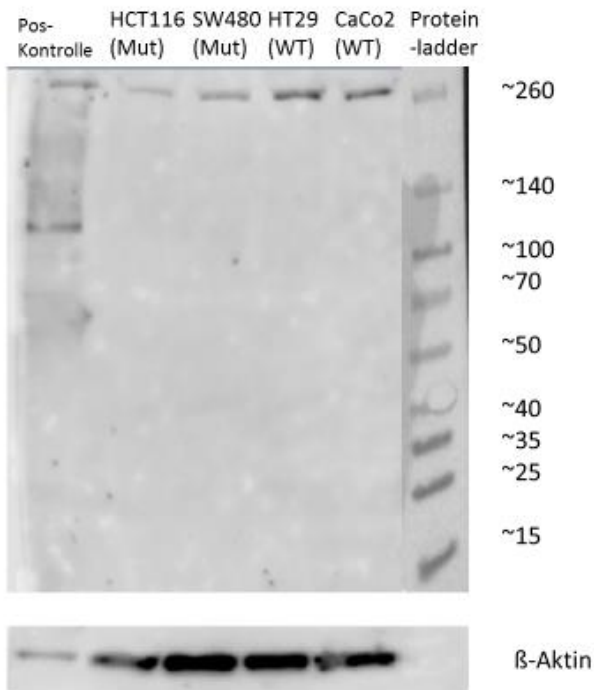
Expression in unterschiedlichen *KRAS*-Genotypen in KRKs zu überprüfen, wurden Wildtyp- (CaCo2) und *KRAS12*-mutierte (SW480) KRK-Zelllinien untersucht. Die CaCo2-Zellen zeigten eine deutliche Expression von GON4L und kleine Mengen an YY1AP1, während in der SW480-Zelllinie überhaupt keine messbare YY1AP1-Expression nachgewiesen werden konnte.



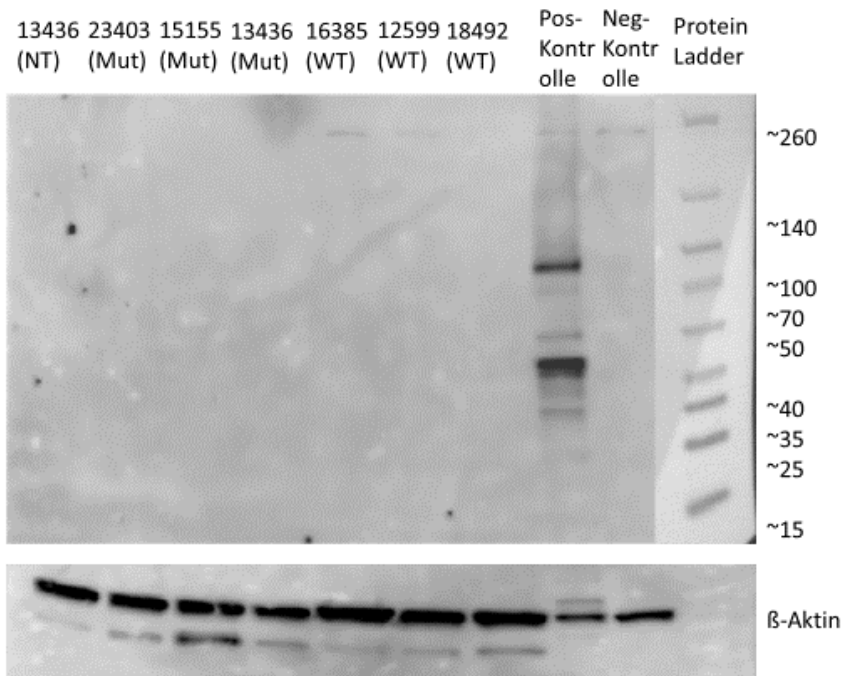
**Abbildung 9: Western Blot mit Nachweis der YY1AP1-Proteinexpression in einer YY1AP1-Positiv-/Negativkontrolle, sowie in KRK-Zelllinien mit unterschiedlichen KRAS-Genotypen.** Spur 1 = Positivkontrolle mit Überexpressionslysat von YY1AP1; Spur 2 = Negativkontrolle mit HEK-Zellen; Spur 3 = CaCo2-Zelllinie (*KRAS*-Wildtyp); Spur 4 = SW480-Zelllinie (*KRAS12*-mutiert).  $\beta$ -Aktinkontrolle (1:10000) positiv. Anti-YY1AP1 1:1000; Sekundärantikörper (anti-Kaninchen/-Maus) 1:4000.

Um Hinweise auf eine differentielle YY1AP1-Expression in unterschiedlichen *KRAS*-Genotypen in KRKs zu finden, wurden im Folgenden noch die Zelllinien (HCT116 und HT29) hinzugenommen und eine niedrigere Antikörper-Verdünnung gewählt. Damit sollten auch geringere Mengen von YY1AP1 nachgewiesen werden. In den untersuchten Zelllinien konnte jedoch nur GON4L (**Abbildung 10**) aber nicht YY1AP1 nachgewiesen werden. Abschließend wurden aus dem Studienkollektiv sieben zufällig gewählte Gewebeproben (ein Nichttumor, drei *KRAS*-mutierte und drei *KRAS*-Wildtyp KRKs) auf eine differenzielle YY1AP1-Expression hin untersucht (**Abbildung 11**). Auch hier fand sich keine messbare YY1AP1-Expression, nur zarte GON4L-Banden in zwei der *KRAS*-Wildtyp-Fälle.





**Abbildung 10: Western Blot mit anti-YY1AP1 an KRK-Zelllinien unterschiedlicher KRAS-Genotypen.** Es fand sich nur eine Bande in jeder Spur bei 260 kD (=GON4L). β-Aktin-Kontrolle positiv (1:10000). Anti-YY1AP1 verdünnt 1:750 und anti-Kaninchen/-Maus 1:2000.



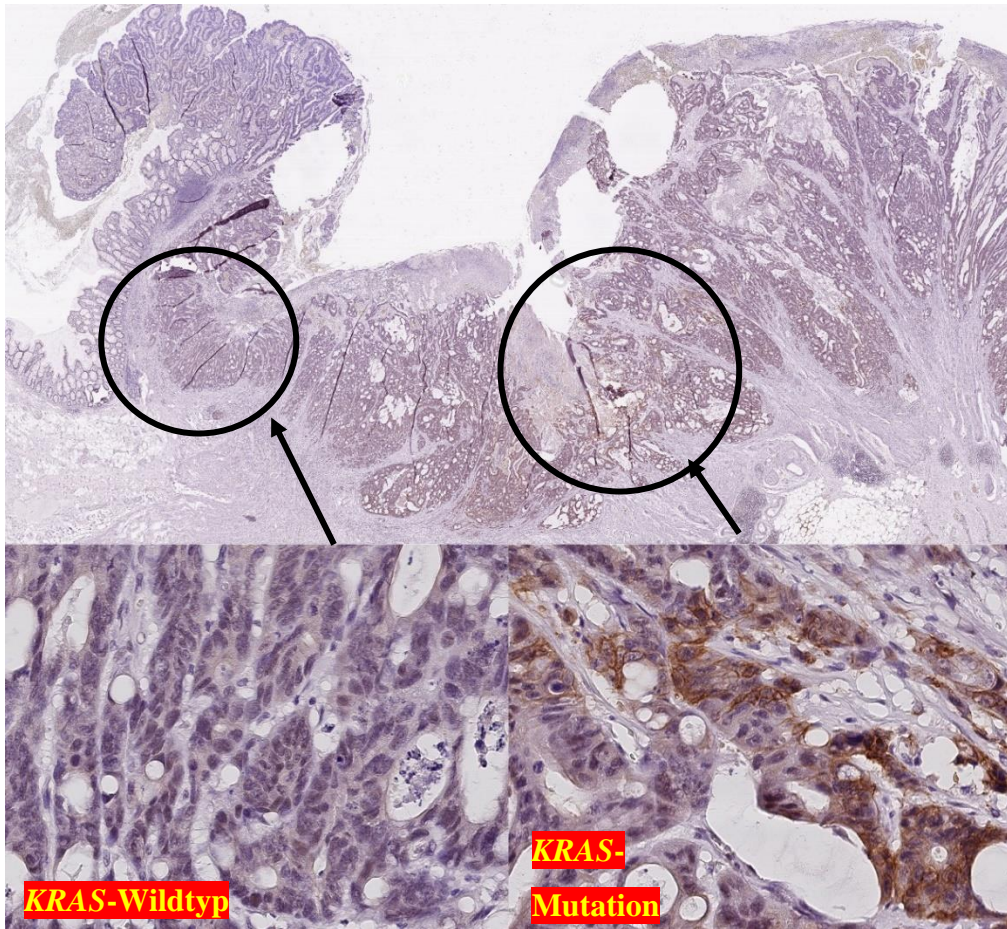
**Abbildung 11: Western Blot mit anti-YY1AP1 an Nichttumorgewebe und KRK-Gewebeproben unterschiedlicher KRAS-Genotypen.** Es war nur eine Bande bei den Fällen 16386 und 12599 bei 260 kDa (=GON4L) nachweisbar. β-Aktin-Kontrolle positiv (1:10000). Anti-YY1AP1 verdünnt 1:750 und anti-Kaninchen/Maus 1:4000.

#### 4.6 Validierung der differentiellen Expression von YY1AP1/GON4L durch Immunhistochemie

Da YY1AP1/GON4L eine heterogene Expression zeigte (siehe oben), konnten keine TMAs zur weiteren Validierung benutzt werden. Deshalb wurde ein Studienkollektiv von 156 Fällen zusammengestellt und Großflächenschnitte zur Validierung angefertigt. Das Testkollektiv wurde dabei um 107 zufällig ausgewählte Fälle mit bekanntem *KRAS*-Mutationsstatus erweitert.

YY1AP1/GON4L wurde in 154 (98,7%) KRKs in den Tumorzellen nachgewiesen. In 83 (53,2%;  $IRS \geq 4$ ) KRKs fand es sich im Kern, bei 27 (17,3%;  $IRS=1$ ) im Zytoplasma, bei 96 (61,5%;  $IRS \geq 1$ ) an der Plasmamembran, bei 29 (18,6%;  $IRS \geq 1$ ) an der apikalen Plasmamembran und bei 85 (54,5%;  $IRS \geq 1$ ) an der basolateralen Plasmamembran. Die Färbung der basolateralen Plasmamembran zeigte sich besonders heterogen in der Intensität und in der Verteilung: 71 (45,5%) Fälle ohne jegliche Immunreaktion und 83 (35,9%) Fälle mit starker Immunfärbung.

Drei Fälle mit einer starken, intratumoralen Heterogenität der basolateralen Plasmamembranfärbung wurden deshalb auf unterschiedliche *KRAS*-Genotypen innerhalb desselben Primärtumors hin untersucht. Dafür wurden basolateral YY1AP1/GON4L-positive und -negative Tumorareale separat mikrodisseziert und einer *KRAS*-Genotypisierung zugeführt. In einem der Fälle konnte eine *KRAS*-Mutation nur in dem basolateral-YY1AP1/GON4L-positiven Areal nachgewiesen werden, während sich in dem basolateral-negativen Areal ein *KRAS*-Wildtyp fand (**Abbildung 12**). Die anderen beiden Fälle zeigten einen konkordanten *KRAS*-Genotyp, was jedoch auch an der technisch schwierigen Durchführbarkeit der Untersuchung liegen könnte.



**Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung des mutationsanalysierten Schnittes für YY1API/GON4L.** Die Expression von YY1API/GON4L zeigte sich teilweise bemerkenswert heterogen, sodass bei drei Schnitten eine *KRAS*-Genotypisierung durchgeführt wurde. Dies zeigt den Schnitt, in dem ein *KRAS*-mutiertes und ein *KRAS*-Wildtyp-Areal innerhalb desselben Primärtumors nachgewiesen werden konnte. Anti-YY1API-Antikörper, Hämalaun gegengefärbt, 1-fache Vergrößerung oben und 400-fache Vergrößerung unten.

#### 4.7 Validierung der differentiellen Expression von hnRNPA1 und PLEKHA2 durch Immunhistochemie

hnRNPA1 und PLEKHA2 wiesen eine homogene Expression im KRK auf, und eigneten sich damit zur Validierung mit Hilfe von TMAs. Die TMAs umfassten 1746 KRKs von 1594 Patienten.

Eine immunhistochemische Färbung von hnRNPA1 konnte in 1631 KRKs bewertet werden. Durch eine Dichotomisierung am Median zeigte sich eine nukleäre Immunreaktion in 693 (42,5%;  $IRS \geq 6$ ) KRKs, eine zytoplasmatische Färbung in 871 (53,4 %;  $IRS=1$ ) und eine Plasmamembranfärbung in 135 (8,3 %;  $IRS=1$ ) Fällen.

Die immunhistochemische Färbung bei PLEKHA2 konnte in 1670 KKKs evaluiert werden. Hier wurde eine nukleäre Immunreaktion bei 949 (56,8 %;  $IRS \geq 1$ ), eine zytoplasmatische bei 724 (43,3%;  $IRS \geq 6$ ) und eine Plasmamembranfärbung bei 6 (0,4 %;  $IRS = 1$ ) KKKs gefunden.

#### 4.8 Korrelation der translationalen Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1API mit dem KRAS-Genotyp

Bei 156 KKK-Patienten war der *KRAS*-Genotyp bekannt (16 Patienten des Gene array Kollektivs und 149 zusätzliche Patienten). Im nächsten Schritt wurde die translationale Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1API/GON4L mit dem *KRAS*-Genotyp verglichen. Hierbei zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem *KRAS*-Genotyp und der basolateralen Plasmamembranexpression von YY1API/GON4L ( $p = 0,002$ ), sowie der zytoplasmatischen Expression von hnRNPA1 ( $p < 0,001$ ; Tabelle 2 und 3). Die Korrelation zwischen dem *KRAS*-Genotyp und der Plasmamembranexpression von hnRNPA1 ( $p = 0,025$ ) und der gesamten Plasmamembranexpression, also basolaterale und apikale Immunreaktionen, von YY1API/GON4L ( $p = 0,048$ ) verloren die Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (**Tabelle 5 und 6**). Interessanterweise und abweichend von der Genexpressionsanalyse durch die Gene Arrays war die Expression von YY1API/GON4L höher in *KRAS*-mutierten KKKs. Es konnte keine Korrelation zwischen der Expression von PLEKHA2 und *KRAS*-Genotyp nachgewiesen werden. Insgesamt fand sich anhand dieser Daten eine *KRAS*-Genotyp abhängige Expression von *hnRNPA1* und *YY1API/GON4L* im KKK.

**Tabelle 5: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für YY1API/GON4L\***

Alle Fälle (n=156)		YY1API Validierungskohorte (Großflächenschnitte)									
		Nukleär		Zytoplasmatisch		Gesamte Plasmamembran		Basolaterale Plasmamembran		Apikale Plasmamembran	
		Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
		n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
<b>Geschlecht</b>	n p(1)	<b>48</b>	<b>0,765</b>	<b>48</b>	<b>0,369</b>	<b>48</b>	<b>0,769</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>
Weiblich		7 (33,3)	14 (66,7)	20 (95,2)	1 (4,8)	8 (38,1)	13 (61,9)	8 (38,1)	13 (61,9)	21 (100,0)	0 (0,0)
Männlich		11 (40,7)	16 (59,3)	23 (85,2)	4 (14,8)	9 (33,3)	18 (66,7)	10 (37,0)	17 (63,0)	26 (96,3)	1 (3,7)
<b>Alter</b>	n p(1)	<b>48</b>	<b>0,073</b>	<b>48</b>	<b>0,180</b>	<b>48</b>	<b>0,367</b>	<b>48</b>	<b>0,234</b>	<b>48</b>	<b>0,479</b>
<71 Jahre		6 (24,0)	19 (76,0)	24 (96,0)	1 (4,0)	7 (28,0)	18 (72,0)	7 (28,0)	18 (72,0)	25 (100,0)	0 (0,0)
≥71 Jahre		12 (52,2)	11 (47,8)	19 (82,6)	4 (17,4)	10 (43,5)	13 (56,5)	11 (47,8)	12 (52,2)	22 (95,7)	1 (4,3)
<b>KRAS Status</b>	n p(1)	<b>156</b>	<b>1,000</b>	<b>156</b>	<b>0,831</b>	<b>156</b>	<b>0,048</b>	<b>156</b>	<b>0,002</b>	<b>156</b>	<b>0,835</b>
Wildtyp		43 (47,3)	48 (52,7)	76 (83,5)	15 (16,5)	41 (45,1)	50 (54,8)	51 (56,0)	40 (44,0)	75 (82,4)	16 (17,6)
Mutation		30 (46,2)	35 (53,8)	53 (81,5)	12 (18,5)	19 (29,2)	46 (70,8)	20 (30,8)	45 (69,2)	52 (80,0)	13 (20,0)
<b>Lokalisation (Zwei Gruppen)</b>	n p(1)	<b>140</b>	<b>0,243</b>	<b>140</b>	<b>0,253</b>	<b>140</b>	<b>1,000</b>	<b>140</b>	<b>0,442</b>	<b>140</b>	<b>0,003</b>
Appendix - rechte Flexur		20 (57,1)	15 (42,9)	28 (80,0)	7 (20,0)	13 (37,1)	22 (62,9)	18 (51,4)	17 (48,6)	23 (65,7)	12 (34,3)
Kolon transversum - Rektum		47 (44,8)	58 (55,2)	93 (88,6)	12 (11,4)	41 (39,0)	64 (61,0)	46 (43,8)	59 (56,2)	94 (89,5)	11 (10,5)
<b>T-Kategorie</b>	n p(2)	<b>153</b>	<b>0,391</b>	<b>153</b>	<b>0,608</b>	<b>153</b>	<b>0,943</b>	<b>153</b>	<b>0,296</b>	<b>153</b>	<b>0,680</b>
T1		7 (63,6)	4 (36,4)	10 (90,9)	1 (9,1)	3 (27,3)	8 (72,7)	3 (27,3)	8 (72,7)	10 (90,9)	1 (9,1)
T2		18 (56,2)	14 (43,8)	24 (75,0)	8 (25,0)	13 (40,6)	19 (59,4)	19 (59,4)	13 (40,6)	21 (65,6)	11 (34,4)
T3		36 (39,6)	55 (60,4)	77 (84,6)	14 (15,4)	37 (40,7)	54 (59,3)	42 (46,2)	49 (53,8)	81 (89,0)	10 (11,0)
T4a		7 (50,0)	7 (50,0)	12 (85,7)	2 (14,3)	5 (35,7)	9 (64,3)	5 (35,7)	9 (64,3)	11 (78,6)	3 (21,4)
T4b		4 (80,0)	1 (20,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	4 (80,0)	2 (40,0)	3 (60,0)
<b>T-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	n p(1)	<b>153</b>	<b>0,106</b>	<b>153</b>	<b>0,474</b>	<b>153</b>	<b>0,856</b>	<b>153</b>	<b>0,471</b>	<b>153</b>	<b>0,065</b>
T1/2		25 (58,1)	18 (41,9)	34 (79,1)	9 (20,9)	16 (37,2)	27 (62,8)	22 (51,2)	21 (48,8)	31 (72,1)	12 (27,9)
T3/4		47 (42,7)	63 (57,3)	93 (84,5)	17 (15,5)	43 (39,1)	67 (60,9)	48 (43,6)	62 (56,4)	94 (85,5)	16 (14,5)
<b>N-Kategorie</b>	n p(2)	<b>48</b>	<b>0,629</b>	<b>48</b>	<b>0,129</b>	<b>48</b>	<b>0,995</b>	<b>48</b>	<b>0,821</b>	<b>48</b>	<b>0,792</b>
N0		9 (34,6)	17 (65,4)	22 (84,6)	4 (15,4)	9 (34,6)	17 (65,4)	10 (38,5)	16 (61,5)	25 (96,2)	1 (3,8)
N1a		2 (100,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)
N1b		5 (62,5)	3 (37,5)	8 (100,0)	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	5 (62,5)	3 (37,5)	8 (100,0)	0 (0,0)
N1c		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
N2a		2 (25,0)	6 (75,0)	8 (100,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100,0)	0 (0,0)
N2b		0 (0,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100,0)	0 (0,0)
<b>N-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	n p(1)	<b>48</b>	<b>0,768</b>	<b>48</b>	<b>0,357</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>
N0		9 (34,6)	17 (65,4)	22 (84,6)	4 (15,4)	9 (34,6)	17 (65,4)	10 (38,5)	16 (61,5)	25 (96,2)	1 (3,8)
N+		9 (40,9)	13 (59,1)	21 (95,5)	1 (4,5)	8 (36,4)	14 (63,6)	8 (36,4)	14 (63,6)	22 (100,0)	0 (0,0)
<b>Stadium (8<sup>th</sup> Ed.)</b>	n p(2)	<b>48</b>	<b>0,944</b>	<b>48</b>	<b>0,182</b>	<b>48</b>	<b>0,707</b>	<b>48</b>	<b>0,523</b>	<b>48</b>	<b>0,729</b>
I		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IIA		8 (33,3)	16 (66,7)	20 (83,3)	4 (16,7)	9 (37,5)	15 (62,5)	10 (41,7)	14 (58,3)	23 (95,8)	1 (4,2)
IIB		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IIC		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IIIA		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
IIIB		7 (53,8)	6 (46,2)	12 (92,3)	1 (7,7)	5 (38,5)	8 (61,5)	5 (38,5)	8 (61,5)	13 (100,0)	0 (0,0)
IIIC		0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
IVA		3 (37,5)	5 (62,5)	8 (100,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	8 (100,0)	0 (0,0)
IVB		0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100,0)	0 (0,0)
<b>Stadium (8<sup>th</sup> Ed.) (Vier Gruppen)</b>	n p(2)	<b>48</b>	<b>0,816</b>	<b>48</b>	<b>0,162</b>	<b>48</b>	<b>0,720</b>	<b>48</b>	<b>0,553</b>	<b>48</b>	<b>0,708</b>
I		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
II a/b/c		8 (33,3)	16 (66,7)	20 (83,3)	4 (16,7)	9 (37,5)	15 (62,5)	10 (41,7)	14 (58,3)	23 (95,8)	1 (4,2)
III a/b/c		7 (50,0)	7 (50,0)	13 (92,9)	1 (7,1)	5 (35,7)	9 (64,3)	5 (35,7)	9 (64,3)	14 (100,0)	0 (0,0)
IV a/b		3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0 (0,0)

Alle Fälle (n=156)		YY1AP1 Validierungskohorte (Großflächenschnitte)									
	n p(2)	Nukleär		Zytoplasmatisch		Gesamte Plasmamembran		Basolaterale Plasmamembran		Apikale Plasmamembran	
		Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
		n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
<b>Tumor Grading</b>		<b>147</b>	<b>0,196</b>	<b>147</b>	<b>0,309</b>	<b>147</b>	<b>0,243</b>	<b>147</b>	<b>0,873</b>	<b>147</b>	<b>0,456</b>
G1		6 (54,5)	5 (45,5)	10 (90,9)	1 (9,1)	4 (36,4)	7 (63,6)	7 (63,6)	4 (36,4)	7 (63,6)	4 (36,4)
G2		55 (48,7)	58 (51,3)	96 (85,0)	17 (15,0)	42 (37,2)	71 (62,8)	50 (44,2)	63 (55,8)	96 (85,0)	17 (15,0)
G3		8 (34,8)	15 (65,2)	18 (78,3)	5 (21,7)	12 (52,2)	11 (47,8)	12 (52,2)	11 (47,8)	19 (82,6)	4 (17,4)
<b>Lymphatische Invasion</b>		<b>48</b>	<b>0,231</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>0,226</b>	<b>48</b>	<b>0,400</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>
L0		17 (41,5)	24 (58,5)	36 (87,8)	5 (12,2)	13 (31,7)	28 (68,3)	14 (34,1)	27 (65,9)	40 (97,6)	1 (2,4)
L1		1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100,0)	0 (0,0)	4 (57,1)	3 (42,9)	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (100,0)	0 (0,0)
<b>Gefäßinvasion</b>		<b>48</b>	<b>0,375</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>0,354</b>	<b>48</b>	<b>0,375</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>
V0		17 (36,2)	30 (63,6)	42 (89,4)	5 (10,6)	16 (34,0)	31 (66,0)	17 (36,2)	30 (63,8)	46 (97,9)	1 (2,1)
V1		1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
<b>Metastasierung</b>		<b>48</b>	<b>0,722</b>	<b>48</b>	<b>0,569</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>	<b>48</b>	<b>0,722</b>	<b>48</b>	<b>1,000</b>
M1		3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0 (0,0)
MX		15 (39,5)	23 (60,5)	33 (86,8)	5 (13,2)	14 (36,8)	24 (63,2)	15 (39,5)	23 (60,5)	37 (97,4)	1 (2,6)
<b>Geamtüberleben [Monate]</b>		<b>48</b>	<b>0,854</b>	<b>48</b>	<b>0,082</b>	<b>48</b>	<b>0,920</b>	<b>48</b>	<b>0,655</b>	<b>48</b>	<b>0,332</b>
n Total		18	30	43	5	17	31	18	30	47	1
n Events		11	18	28	1	10	19	10	19	29	0
Median survival±SD		61.8±17.3	65.6±6.1	65.1±10.7	*1	80.9±18.5	65.6±9.5	80.9±25.2	65.5±11.2	*1	*1
95% Ci.		27.9-95.8	53.6-77.6	44.1-86.1	*1	44.5-117.2	46.9-84.3	31.5-130.2	43.6-87.4	*1	*1
five-year survival±SD		50±11.8	56.7±9.0	51.2±7.6	80.0±17.9	58.8±11.9	51.6±9.0	61.1±11.5	50.0±9.1	55.3±7.3	*1
<b>Tumorspezifisches Überleben [Monate]</b>		<b>47</b>	<b>0,846</b>	<b>47</b>	<b>0,082</b>	<b>47</b>	<b>0,550</b>	<b>47</b>	<b>0,394</b>	<b>47</b>	<b>0,454</b>
n Total		17	30	42	5	16	31	17	30	46	1
n Events		6	12	18	0	5	13	5	13	18	0
Median survival±SD		*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1
95% Ci.		*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1	*1
five-year survival±SD		62.7±12.3	67.3±9.0	64.4±7.7	*2	66.3±12.4	65.3±9.0	68.4±11.7	64.1±9.3	67.7±7.2	*1

Tabelle 6: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für hnRNPA1\*

Alle Fälle (n=1786)		HNRNPA1 (TMAs)						
		Nukleär		Zytoplasmatisch		Plasmamembran		
		Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	
		n %	n %	n %	n %	n %	n %	
<b>Geschlecht</b>	n	p(1)	<b>1474</b>	<b>0,833</b>	<b>1474</b>	<b>0,175</b>	<b>1473</b>	<b>0,566</b>
Weiblich			419 (57,9)	305 (42,1)	349 (48,2)	375 (51,8)	662 (91,6)	61 (8,4)
Männlich			429 (57,2)	321 (42,8)	335 (44,7)	415 (55,3)	693 (92,4)	57 (7,6)
<b>Alter</b>	n	p(1)	<b>1474</b>	<b>0,317</b>	<b>1474</b>	<b>0,042</b>	<b>1473</b>	<b>0,701</b>
<71 Jahre			402 (56,1)	314 (43,9)	352 (49,2)	364 (50,8)	660 (92,3)	55 (7,7)
≥71 Jahre			446 (58,8)	312 (41,2)	332 (43,8)	426 (56,2)	695 (91,7)	63 (8,3)
<b>KRAS Status</b>	n	p(1)	<b>108</b>	<b>0,447</b>	<b>108</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>108</b>	<b>0,025</b>
Wildtyp			28 (47,5)	31 (52,5)	40 (67,8)	19 (32,2)	55 (93,2)	4 (6,8)
Mutation			27 (55,1)	22 (44,9)	15 (30,6)	34 (69,4)	38 (77,6)	11 (22,4)
<b>Lokalisation (Zwei Gruppen)</b>	n	p(1)	<b>1537</b>	<b>0,045</b>	<b>1537</b>	<b>0,003</b>	<b>1536</b>	<b>0,007</b>
Appendix - rechte Flexur			284 (53,7)	245 (46,3)	218 (41,2)	311 (58,8)	473 (89,4)	56 (10,6)
Kolon transversum - Rektum			595 (59,0)	413 (41,0)	498 (49,4)	510 (50,6)	941 (93,4)	66 (6,6)
<b>T-Kategorie</b>	n	p(2)	<b>1630</b>	<b>0,017</b>	<b>1630</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1629</b>	<b>0,001</b>
T1			53 (64,6)	29 (35,4)	47 (57,3)	35 (42,7)	81 (98,8)	1 (1,2)
T2			218 (62,8)	129 (37,2)	183 (52,7)	164 (47,3)	329 (95,1)	17 (4,9)
T3			508 (55,4)	409 (44,6)	414 (45,1)	503 (54,9)	829 (90,4)	88 (9,6)
T4a			111 (56,6)	85 (43,4)	84 (42,9)	112 (57,1)	177 (90,3)	19 (9,7)
T4b			47 (53,4)	41 (46,6)	31 (35,2)	57 (64,8)	78 (88,6)	10 (11,4)
<b>T-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	n	p(1)	<b>1630</b>	<b>0,006</b>	<b>1630</b>	<b>0,001</b>	<b>1629</b>	<b>&lt;0,001</b>
T1/2			271 (63,2)	158 (36,8)	230 (53,6)	199 (46,4)	410 (95,8)	18 (4,2)
T3/4			666 (55,5)	535 (44,5)	529 (44,0)	672 (56,0)	1084 (90,3)	117 (9,7)
<b>N-Kategorie</b>	n	p(3)	<b>1456</b>	<b>0,536</b>	<b>1456</b>	<b>0,098</b>	<b>1455</b>	<b>0,007</b>
N0			465 (58,0)	337 (42,0)	392 (48,9)	410 (51,1)	751 (93,8)	50 (6,2)
N1a			84 (58,3)	60 (41,7)	64 (44,4)	80 (55,6)	134 (93,1)	10 (6,9)
N1b			91 (56,5)	70 (43,5)	59 (36,6)	102 (63,4)	139 (86,3)	22 (13,7)
N1c			2 (66,7)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100,0)	0 (0,0)
N2a			103 (64,0)	58 (36,0)	67 (41,6)	94 (58,4)	145 (90,1)	16 (9,9)
N2b			94 (50,8)	91 (49,2)	91 (49,2)	94 (50,8)	167 (90,3)	18 (9,7)
<b>N-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	n	p(1)	<b>1456</b>	<b>0,790</b>	<b>1456</b>	<b>0,030</b>	<b>1455</b>	<b>0,008</b>
N0			465 (58,0)	337 (42,0)	392 (48,9)	410 (51,1)	751 (93,8)	50 (6,2)
N+			374 (57,2)	280 (42,8)	282 (43,1)	372 (56,9)	588 (89,9)	66 (10,1)
<b>Stadium (7<sup>th</sup> Ed.)</b>	n	p(3)	<b>1474</b>	<b>0,745</b>	<b>1474</b>	<b>0,009</b>	<b>1473</b>	<b>0,005</b>
I			188 (63,7)	107 (36,3)	157 (53,2)	138 (46,8)	286 (97,3)	8 (2,7)
IIA			226 (53,1)	200 (46,9)	202 (47,4)	224 (52,6)	387 (90,8)	39 (9,2)
IIB			20 (52,6)	18 (47,4)	18 (47,4)	20 (52,6)	36 (94,7)	2 (5,3)
IIC			11 (44,0)	14 (56,0)	10 (40,0)	15 (60,0)	24 (96,0)	1 (4,0)
IIIA			23 (52,3)	21 (47,7)	20 (45,5)	24 (54,5)	41 (93,2)	3 (6,8)
IIIB			182 (60,3)	120 (39,7)	121 (40,1)	181 (59,9)	271 (89,7)	31 (10,3)
IIIC			88 (50,3)	87 (49,7)	85 (48,6)	90 (51,4)	152 (86,9)	23 (13,1)
IVA			74 (66,1)	38 (33,9)	50 (44,6)	62 (55,4)	103 (92,0)	9 (8,0)
IVB			36 (63,2)	21 (36,8)	21 (36,8)	36 (63,2)	55 (96,5)	2 (3,5)
<b>Stadium (7<sup>th</sup> Ed.) (Vier Gruppen)</b>	n	p(2)	<b>1474</b>	<b>0,970</b>	<b>1474</b>	<b>0,004</b>	<b>1473</b>	<b>0,006</b>
I			188 (63,7)	107 (36,3)	157 (53,2)	138 (46,8)	286 (97,3)	8 (2,7)
II a/b/c			257 (52,6)	232 (47,4)	230 (47,0)	259 (53,0)	447 (91,4)	42 (8,6)
III a/b/c			293 (56,2)	228 (43,8)	226 (43,4)	295 (56,6)	464 (89,1)	57 (10,9)
IV a/b			110 (65,1)	59 (34,9)	71 (42,0)	98 (58,0)	158 (93,5)	11 (6,5)
<b>Tumor Grading</b>	n	p(2)	<b>1603</b>	<b>0,515</b>	<b>1603</b>	<b>0,029</b>	<b>1602</b>	<b>0,168</b>
G1			28 (57,1)	21 (42,9)	22 (44,9)	27 (55,1)	45 (91,8)	4 (8,2)
G2			728 (58,1)	526 (41,9)	568 (45,3)	686 (54,7)	1157 (92,3)	96 (7,7)
G3			167 (55,7)	133 (44,3)	158 (52,7)	142 (47,3)	269 (89,7)	31 (10,3)
<b>Lymphatische Invasion</b>	n	p(1)	<b>1474</b>	<b>0,115</b>	<b>1474</b>	<b>0,133</b>	<b>1473</b>	<b>0,077</b>
L0			647 (58,7)	455 (41,3)	524 (47,5)	578 (52,5)	1021 (92,7)	80 (7,3)
L1			201 (54,0)	171 (46,0)	160 (43,0)	212 (57,0)	334 (89,8)	38 (10,2)
<b>Gefäßinvasion</b>	n	p(1)	<b>1474</b>	<b>0,472</b>	<b>1474</b>	<b>0,025</b>	<b>1473</b>	<b>0,022</b>
V0			792 (57,8)	578 (42,2)	647 (47,2)	723 (52,8)	1266 (92,5)	103 (7,5)
V1			56 (53,8)	48 (46,2)	37 (35,6)	67 (64,4)	89 (85,6)	15 (14,4)
<b>Metastasierung</b>	n	p(1)	<b>1474</b>	<b>0,032</b>	<b>1474</b>	<b>0,288</b>	<b>1473</b>	<b>0,547</b>
M1			111 (65,3)	59 (34,7)	72 (42,4)	98 (57,6)	159 (93,5)	11 (6,5)
MX			737 (56,5)	567 (43,5)	612 (46,9)	692 (53,1)	1196 (91,8)	107 (8,2)

#### 4.9 Validierung der differentiellen Genexpression von YY1AP1 durch qRT-PCR

Aufgrund der gegensätzlichen Resultate auf transkriptioneller und translationaler Ebene für YY1AP1/GON4L wurde eine zusätzliche qRT-PCR zur Validierung der differentiellen Expression von YY1AP1 durchgeführt. Hiermit wurden die Gene Array - Ergebnisse mit einer anderen Methode validiert und zusätzlich eine Betrachtung der GON4L-Expression studiert. Es wurde dasselbe Testkollektiv der Gene Arrays genutzt, welches acht *KRAS*-Wildtyp und acht *KRAS*-mutierte KRKs enthielt. Die RNA wurde für diese quantitative Expressionsanalyse aus Kryogewebeproben isoliert und ein Vergleich der Genexpression in *KRAS*-Wildtyp- und *KRAS*-mutierten Tumoren durchgeführt. Es bestätigte sich eine signifikante Korrelation zwischen YY1AP1-Expression und dem *KRAS*-Genotyp. Die mRNA-Spiegel waren im *KRAS*-Wildtyp KRKs höher als in den *KRAS*-mutierten KRKs (**Tabelle 7**;  $p=0.009$ ). Somit konnten die Gene Array-Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. GON4L hingegen zeigte keine Korrelation mit dem *KRAS*-Genotyp in der qRT-PCR.

**Tabelle 7: Korrelation der gemittelten relativen qRT-PCR-Expressionswerte zum *KRAS*-Genotyp und der Tumorentität für YY1AP1 und GON4L.**

Quantitative Real-time PCR Daten													
		YY1AP1						GON4L					
		n		Malignität		KRAS-Status		n		Malignität		KRAS-Status	
				NT	TU	WT	MUT			NT	TU	WT	MUT
KRAS-Status	WT	8	0,597	-0,54	-0,46			8	0,002	-0,31	-0,59		
	MUT	8	0,331	-0,74	-0,95			8	0,006	-0,36	-0,68		
Malignität	NT	8	0,258			-0,54	-0,74	8	0,413			-0,31	-0,36
	TU	8	0,009			-0,46	-0,95	8	0,339			-0,59	-0,68

#### 4.10 Korrelation der translationalen Expression von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1/GON4L mit klinisch-pathologischen Parametern

Als nächstes wurde die Expression von *hnRNPA1*-, *PLEKHA2*- und *YY1AP1/GON4L* mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert.

Abhängig von der subzellulären Lokalisation fand sich bei einer nukleären Expression von *hnRNPA1* eine Korrelation mit der Tumorlokalisierung ( $p=0,004$ ) und der T-Kategorie ( $p=0,006$ ). Die zytoplasmatische Expression korrelierte mit der Tumorlokalisierung ( $p=0,001$ ), T-Kategorie ( $p<0,000$ ) und dem Tumorstadium (I vs. II vs. III vs. IV;  $p=0,004$ ). Letztlich korrelierte die Plasmamembranexpression hoch signifikant mit der T-Kategorie ( $p=0,001$ ) und dem Tumorstadium ( $p=0,005$ ) (**Tabelle 6**).



Die zytoplasmatische Expression von PLEKHA2 korrelierte mit der Tumorlokalisation ( $p=0,001$ ), der T-Kategorie ( $p<0,000$ ), dem Tumorstadium ( $p=0,002$ ), der Lymphgefäßinvasion ( $p=0,002$ ) und dem Tumorgrading ( $p=0,001$ ). Die nukleäre Expression von PLEKHA2 korrelierte nur mit dem Patientenalter ( $p=0,001$ ) (**Tabelle 8**).

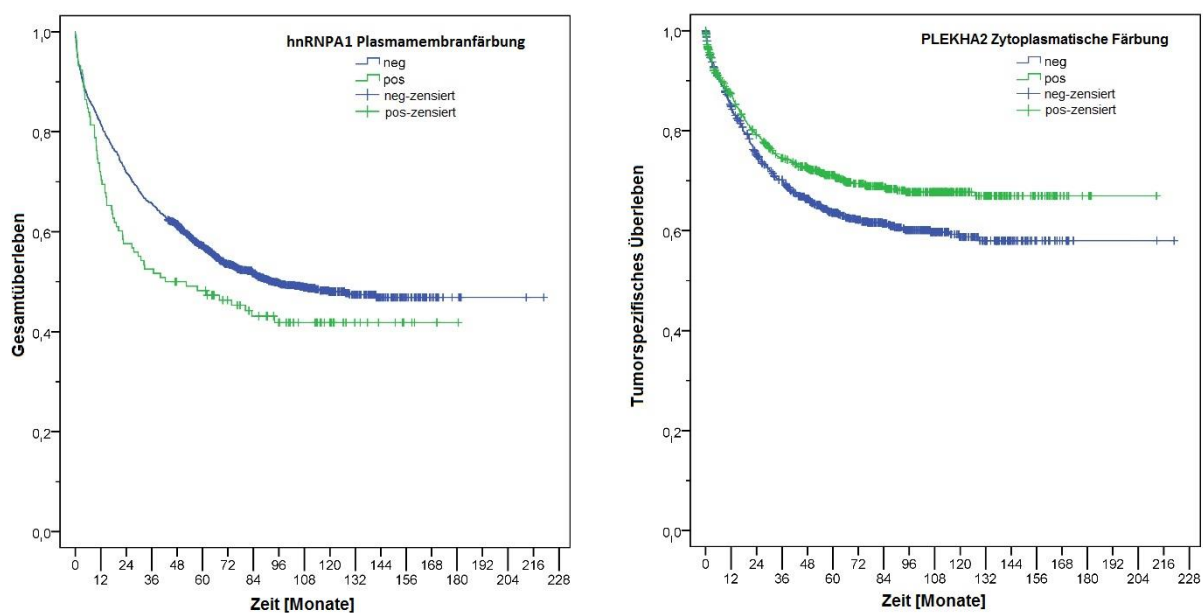
Die apikale Plasmamembranexpression von YY1AP1/GON4L korrelierte nur mit der Tumorlokalisation ( $p=0,003$ ) (**Tabelle 5**).

Tabelle 8: Korrelation mit KRAS-Genotyp und klinisch-pathologischen Parametern für PLEKHA2\*

Alle Fälle (n=1786)			PLEKHA2 (TMAs)					
			Nukleär		Zytoplasmatisch		Plasmamembran	
			Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
			n %	n %	n %	n %	n %	n %
<b>Geschlecht</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1514</b>	<b>0,029</b>	<b>1514</b>	<b>0,070</b>	<b>1514</b>	<b>1,000</b>
Weiblich			342 (45,8)	404 (54,2)	438 (58,7)	308 (41,3)	744 (99,7)	2 (0,3)
Männlich			309 (40,2)	459 (59,8)	415 (54,0)	353 (46,0)	766 (99,7)	2 (0,3)
<b>Alter</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1514</b>	<b>0,001</b>	<b>1514</b>	<b>0,120</b>	<b>1514</b>	<b>1,000</b>
<71 Jahre			286 (38,8)	452 (61,2)	431 (58,4)	307 (41,6)	736 (99,7)	2 (0,3)
≥71 Jahre			365 (47,0)	411 (53,0)	422 (54,4)	354 (45,6)	774 (99,7)	2 (0,3)
<b>KRAS Status</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>109</b>	<b>1,000</b>	<b>109</b>	<b>0,333</b>	<b>109</b>	<b>0,192</b>
Wildtyp			26 (42,6)	35 (57,4)	36 (59,0)	25 (41,0)	61 (100,0)	0 (0,0)
Mutation			21 (43,8)	27 (56,2)	23 (47,9)	25 (52,1)	46 (95,8)	2 (4,2)
<b>Lokalisation (Zwei Gruppen)</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1574</b>	<b>0,453</b>	<b>1574</b>	<b>0,002</b>	<b>1574</b>	<b>1,000</b>
Appendix - rechte Flexur			241 (44,7)	298 (55,3)	332 (61,6)	207 (38,4)	537 (99,6)	2 (0,4)
Kolon transversum - Rektum			441 (42,6)	594 (57,4)	554 (53,5)	481 (46,5)	1031 (99,6)	4 (0,4)
<b>T-Kategorie</b>	<b>n</b>	<b>p(2)</b>	<b>1669</b>	<b>0,686</b>	<b>1669</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1669</b>	<b>0,018</b>
T1			37 (43,0)	49 (57,0)	40 (46,5)	46 (53,5)	86 (100,0)	0 (0,0)
T2			160 (44,1)	203 (55,9)	191 (52,6)	172 (47,4)	363 (100,0)	0 (0,0)
T3			406 (43,2)	534 (56,8)	530 (56,4)	410 (43,6)	937 (99,7)	3 (0,3)
T4a			86 (44,3)	108 (55,7)	133 (68,6)	61 (31,4)	193 (99,5)	1 (0,5)
T4b			33 (38,4)	53 (61,6)	52 (60,5)	34 (39,5)	84 (97,7)	2 (2,3)
<b>T-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1669</b>	<b>0,781</b>	<b>1669</b>	<b>0,010</b>	<b>1669</b>	<b>0,200</b>
T1/2			197 (43,9)	252 (56,1)	231 (51,4)	218 (48,6)	449 (100,0)	0 (0,0)
T3/4			525 (43,0)	695 (57,0)	715 (58,6)	505 (41,4)	1214 (99,5)	6 (0,5)
<b>N-Kategorie</b>	<b>n</b>	<b>p(3)</b>	<b>1497</b>	<b>0,168</b>	<b>1497</b>	<b>0,014</b>	<b>1497</b>	<b>0,154</b>
N0			370 (44,4)	463 (55,6)	455 (54,6)	378 (45,4)	832 (99,9)	1 (0,1)
N1a			58 (39,7)	88 (60,3)	74 (50,7)	72 (49,3)	146 (100,0)	0 (0,0)
N1b			86 (50,3)	85 (49,7)	97 (56,7)	74 (43,3)	170 (99,4)	1 (0,6)
N1c			1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100,0)	0 (0,0)
N2a			56 (37,1)	95 (62,9)	95 (62,9)	56 (37,1)	151 (100,0)	0 (0,0)
N2b			75 (38,9)	118 (61,1)	124 (64,2)	69 (35,8)	191 (99,0)	2 (1,0)
<b>N-Kategorie (Zwei Gruppen)</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1497</b>	<b>0,271</b>	<b>1497</b>	<b>0,093</b>	<b>1497</b>	<b>0,328</b>
N0			370 (44,4)	463 (55,6)	455 (54,6)	378 (45,4)	832 (99,9)	1 (0,1)
N+			276 (41,6)	388 (58,4)	392 (59,0)	272 (41,0)	661 (99,5)	3 (0,5)
<b>Stadium (7<sup>th</sup> Ed.)</b>	<b>n</b>	<b>p(3)</b>	<b>1514</b>	<b>0,852</b>	<b>1514</b>	<b>0,002</b>	<b>1514</b>	<b>0,227</b>
I			133 (42,4)	181 (57,6)	162 (51,6)	152 (48,4)	314 (100,0)	0 (0,0)
IIA			191 (44,0)	243 (56,0)	238 (54,8)	196 (45,2)	434 (100,0)	0 (0,0)
IIB			22 (57,9)	16 (42,1)	24 (63,2)	14 (36,8)	37 (97,4)	1 (2,6)
IIC			8 (30,8)	18 (69,2)	16 (61,5)	10 (38,5)	25 (96,2)	1 (3,8)
IIIA			17 (37,0)	29 (63,0)	21 (45,7)	25 (54,3)	46 (100,0)	0 (0,0)
IIIB			133 (43,6)	172 (56,4)	165 (54,1)	140 (45,9)	305 (100,0)	0 (0,0)
IIIC			69 (39,4)	106 (60,6)	114 (65,1)	61 (34,9)	173 (98,9)	2 (1,1)
IVA			56 (48,3)	60 (51,7)	70 (60,3)	46 (39,7)	116 (100,0)	0 (0,0)
IVB			22 (36,7)	38 (63,3)	43 (71,7)	17 (28,3)	60 (100,0)	0 (0,0)
<b>Stadium (7<sup>th</sup> Ed.) (Vier Gruppen)</b>	<b>n</b>	<b>p(2)</b>	<b>1514</b>	<b>0,916</b>	<b>1514</b>	<b>0,014</b>	<b>1514</b>	<b>0,796</b>
I			133 (42,4)	181 (57,6)	162 (51,6)	152 (48,4)	314 (100,0)	0 (0,0)
II a/b/c			221 (44,4)	277 (55,6)	278 (55,8)	220 (44,2)	496 (99,6)	2 (0,4)
III a/b/c			219 (41,6)	307 (58,4)	300 (57,0)	226 (43,0)	524 (99,6)	2 (0,4)
IV a/b			78 (44,3)	98 (55,7)	113 (64,2)	63 (35,8)	176 (100,0)	0 (0,0)
<b>Tumor Grading</b>	<b>n</b>	<b>p(2)</b>	<b>1640</b>	<b>0,290</b>	<b>1640</b>	<b>0,001</b>	<b>1640</b>	<b>1,000</b>
G1			18 (34,6)	34 (65,4)	29 (55,8)	23 (44,2)	52 (100,0)	0 (0,0)
G2			556 (43,2)	730 (56,8)	702 (54,6)	584 (45,4)	1281 (99,6)	5 (0,4)
G3			136 (45,0)	166 (55,0)	199 (65,9)	103 (34,1)	301 (99,7)	1 (0,3)
<b>Lymphatische Invasion</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1514</b>	<b>0,810</b>	<b>1514</b>	<b>0,002</b>	<b>1514</b>	<b>1,000</b>
L0			488 (42,8)	652 (57,2)	616 (54,0)	524 (46,0)	1137 (99,7)	3 (0,3)
L1			163 (43,6)	211 (56,4)	237 (63,4)	137 (36,6)	373 (99,7)	1 (0,3)
<b>Gefäßinvasion</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1514</b>	<b>0,188</b>	<b>1514</b>	<b>0,223</b>	<b>1514</b>	<b>0,252</b>
V0			612 (43,5)	796 (56,5)	787 (55,9)	621 (44,1)	1405 (99,8)	3 (0,2)
V1			39 (36,8)	67 (63,2)	66 (62,3)	40 (37,7)	105 (99,1)	1 (0,9)
<b>Metastasierung</b>	<b>n</b>	<b>p(1)</b>	<b>1514</b>	<b>0,686</b>	<b>1514</b>	<b>0,024</b>	<b>1514</b>	<b>1,000</b>
M1			79 (44,6)	98 (55,4)	114 (64,4)	63 (35,6)	177 (100,0)	0 (0,0)
MX			572 (42,8)	765 (57,2)	739 (55,3)	598 (44,7)	1333 (99,7)	4 (0,3)

#### 4.11 Die prognostische Signifikanz der hnRNPA1- und PLEKHA2-Expression in der univariaten Überlebensanalyse

Als nächstes wurde die prognostische Relevanz von hnRNPA1 und PLEKHA2 untersucht. Die Plasmamembranexpression von hnRNPA1 korrelierte signifikant mit einem reduzierten Fünf-Jahres-Überleben [Fünf-Jahres-Überleben ( $\pm$ SD):  $57,0 \pm 1,4$  vs.  $47,3 \pm 4,6$ ;  $p=0,048$ ]. Es fand sich keine Assoziation zum tumorspezifischen Überleben. Im Gegensatz dazu konnte die zytoplasmatische Expression von PLEKHA2 mit einem besseren tumorspezifischen Überleben [Fünf-Jahres-Überleben ( $\pm$ SD):  $70,9 \pm 1,8$  vs.  $63,4 \pm 1,7$ ;  $p=0,005$ ] assoziiert werden (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13: Univariate Überlebensanalyse von PLEKHA2 und hnRNPA1.** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt in A ein schlechteres Gesamtüberleben (*overall survival*) bei plasmamembranär-positivem hnRNPA1 ( $p=0,048$ ) und in B ein schlechteres tumorspezifisches Überleben (*tumorspecific survival*) bei zytoplasmatisch-positivem PLEKHA2 ( $p=0,005$ ) im kolorektalen Karzinom.

#### 4.12 Multivariate Überlebensanalyse von hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1

Eine Cox-Regressionsanalyse wurde für alle Parameter, die einen  $p$ -Wert  $<0,1$  in der univariaten Überlebensanalyse vorwiesen, durchgeführt. Neben vielen klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, T-, N-, M-Stadium, Hämangio- und Lymphgefäßinvasion sowie Tumorgrading, waren zytoplasmatisches YY1AP1/GON4L (Gesamt- und tumorspezifisches Überleben), zytoplasmatisches (tumorspezifisches Überleben) und plasmamembranäres (Gesamt- und tumorspezifisches Überleben) PLEKHA2 und letztlich plasmamembranäres hnRNPA1 (Gesamtüberleben) inkludiert. Sieben Parameter in der

hnRNPA1- und sechs Parameter in der PLEKHA2-Kohorte verblieben im Cox-Modell nachdem die backward LR-Methode mit pin=0,05 und pout=0,05 angewendet wurde. Bei YY1AP1/GON4L konnte keine Cox-Regression angewendet werden, da die Koeffizienten nicht miteinander konvergierten. Die verbliebenen Parameter waren für hnRNPA1 sowie für PLEKHA2 Geschlecht, Alter, T-, N-, M-Stadium und lymphatische Invasion. Interessanterweise zeigte sich die plasmamembranäre Expression von hnRNPA1 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Patientenüberleben (**Tabelle 9**).

**Tabelle 9: Multivariate Überlebensanalyse anhand der Cox-Regressionsmodell für hnRNPA1**

HNRNPA1 - Gesamtüberleben			
	HR	[95% KI]	p-Wert
Geschlecht	0,753	[0,644-0,879]	<0,001
Alter	2,169	[1,845-2,551]	<0,001
T			<0,001
T2 vs. T1	0,984	[0,567-1,709]	0,954
T3 vs. T1	1,453	[0,862-2,45]	0,161
T4a vs. T1	2,359	[1,353-4,113]	0,002
T4b vs. T1	2,549	[1,416-4,589]	0,002
N			<0,001
N1a vs. N0	1,063	[0,794-1,425]	0,680
N1b vs. N0	1,376	[1,061-1,783]	0,016
N1c vs. N0	6,092	[1,916-19,375]	0,002
N2a vs. N0	1,937	[1,501-2,501]	<0,001
N2b vs. N0	2,822	[2,185-3,644]	<0,001
M	1,996	[1,609-2,475]	<0,001
L	1,255	[1,027-1,534]	0,026
V			
G			
Lokalisation			
HNRNPA1 Plasmamembranfärbung	1,319	[1,006-1,729]	0,045

## 5 Diskussion

In 25 % der Tumoren des Menschen findet sich eine Mutation in den GTPasen der RAS-Familie (KRAS, NRAS und HRAS), die bekannt sind für ihre Rolle in der Karzinogenese verschiedenster Tumoren [15]. Die Proteine sind in einer Reihe von Signalwegen und darüberhinaus in der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen involviert. Als die bekanntesten Effektor-Signalwege sind zum einen der RAF-MEK-ERK-Signalweg und zum anderen die Effektor Proteinfamilie der Phosphoinositiden 3-Kinasen (PI3Ks) zu nennen [6, 15, 57]. Proteine der RAF-Familie induzieren die Transduktion zur Plasmamembran hin und führen zur Zellteilung und –wachstum [66]. Die PI3Ks fungieren ebenfalls als wichtige RAS-abhängige Mediatoren und werden durch Missense-Mutationen im *PIK3CA*-Gen, welche man häufig in Brust-, Kolon-, Lungen- und Hirntumoren findet, gefördert [60, 67, 72].

Schätzungsweise 40% der KRKs sind *KRAS* mutiert [19]. Dies ist mit schlechterem Patientenüberleben, höherer Tumoraggressivität in höheren Tumorstadien [2, 3] und mit abweichendem metastatischem Verhalten assoziiert [45, 59, 68]. Darüber hinaus scheint der Mutationsstatus einen relevanten Einfluss auf Therapieeffekte zu nehmen wie es bereits bei den anti-EGFR Antikörpern (Cetuximab oder Panitumumab) gezeigt werden konnte. Angriffspunkt der anti-EGFR-Antikörper ist das Transmembranprotein EGFR, welches zur Familie der Tyrosinkinase-Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehört, und über eine Phosphorylierung das *KRAS*-Protein aktiviert [75]. Dabei kann die prätherapeutische Testung des *KRAS*-Genotyps beim KRK heutzutage eine Vorhersage zur Effizienz der Therapie geben, da nur *KRAS*-Wildtyp Tumoren auf diese Art von Behandlung relevant anzusprechen scheinen [29, 65, 78]. Erschwerend kommen in diesem Fall jedoch weitere Mutationen in der *KRAS*-Kaskade hinzu, die zum Einen zu einem verminderten Gesamt- oder progressfreien Überleben und zum Anderen ebenfalls zu Therapieresistenzen führen können. Circa 2-4% der KRKs weisen beispielsweise eine *NRAS*-Mutation auf, die ebenfalls ein schlechteres Gesamtüberleben bedingen ebenso wie eine *KRAS*-, *BRAF*-, *PI3KCA*- oder *PTEN*-Mutation zu einer vermehrten Resistenz gegen anti-EGFR Antikörper führen können [47, 76, 83].

Trotz der Fortschritte in der gezielten Krebstherapie wie durch die eben genannten anti-EGFR-Antikörper, gibt es noch immer eine signifikante Anzahl an *KRAS*-Wildtyp KRK, die nicht auf die Therapie ansprechen und einige *KRAS*-mutierte Fälle, die wiederum auf die Therapie ansprechen, sodass sich die Frage nach Querverbindungen der Signalkaskaden und anderen regulierenden Mutationen stellt.

In neueren Studien wurde versucht, die Cetuximab-Resistenz in mutierten *KRAS* KRKs zu umgehen, indem die oben genannten “Downstream”-Effektoren ins Visier genommen wurden. Hierzu berichtete erst kürzlich eine Studie von einer Kombination aus Cetuximab und BKM120, welches den *PI3KCA*- Signalweg anvisiert und dadurch einer vermehrte antitumoröse Aktivität gegen *KRAS* mutierte / *PI3KCA* wildtyp LoVo Zellen hervorruft [41]. Eine andere Studie konnte durch eine doppelte Blockade mit Cetuximab und einem MAPK-Inhibitor (hier pan-RAF inhibitor LY3009120) bei *KRAS*- oder *BRAF*-mutierten KRKs einen synergistischen Effekt erzielen [87]. Dies zeigt die Komplexität der Interaktionen unterschiedlicher *KRAS*-abhängiger Signalwege, sodass weitere Untersuchungen zur *KRAS*-abhängigen Tumorbiologie dringend benötigt werden, um die personalisierte Diagnostik und Therapie von KRKs zu verbessern.

In der vorliegenden Studie wurden Gene gesucht, die bei *KRAS*-mutierten KRKs differenziell exprimiert werden, um damit das Verständnis der Effekte der *KRAS*-Mutation auf transkriptioneller und translationaler Genexpressionsebene zu verbessern. Der Nachweis von insgesamt 475 differentiell exprimierten Genen belegt den Effekt der *KRAS*-Mutation auf die Genexpressionsmuster im KRK. Um die potentielle tumorbiologische Bedeutung der differentiellen Genexpression zu untersuchen, wurden drei Zielgene für weitere Validierungsstudien ausgewählt. Für die Validierung wurde vorrangig die Immunhistochemie verwendet. Vorteile sind die Detektion translationaler Produkte und die Anwendung an großen Patientenkohorten (>1000 Patientenproben). Damit konnte eine *KRAS*-abhängige differentielle Expression von *hnRNPA1* und *YY1API/GON4L* nachgewiesen werden. Vor allem die zytoplasmatische *hnRNPA1*- und die basolaterale plasmamembranäre *YY1API/GON4L*-Expression korrelierten signifikant mit dem *KRAS*-Genotyp.

*HnRNPA1* gehört zu der “heterogeneous nuclear ribonucleoprotein” (*hnRNP*) Familie, welche auf 20 Polypeptiden basieren [35, 38]. Es wurde bisher im Zusammenhang mit der Entwicklung von Telomeren, Transkription, mRNA-Export, pre-mRNA Splicingregulation und der DNA-Replikation sowie DNA-Reparatur gebracht [21]. Vorausgehende Studien haben bisher nur kleinere KRK-Kohorten untersucht und hier bereits *hnRNPA1* als einen Biomarker vorgeschlagen [52]. Die zytoplasmatische Expression von *hnRNPA1* war im proximalen Kolon stärker. Dies stimmt mit Beobachtungen einer Studie überein, die eine geringere Prävalenz von *KRAS*-Mutationen in linksseitigen Tumoren nachgewiesen hat [19]. Xodo et al. entdeckten zudem eine Transkriptionsregulationsaktivität von *hnRNPA1* und dessen Isoform UP1 durch eine Bindung und Entfaltung der G-Quadruplexe am kritischen *KRAS*-Promoterelement [86].

Die erhöhte Expression von hnRNPA1 auf transkriptioneller und translationaler Ebene mag auf einer erhöhten Regulationsaktivität in *KRAS*-mutierten KRKs hinweisen, eventuell auch bedingt durch hnRNPA1s „Shuttling“ zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma [14, 79]. hnRNPA1 entfaltet seine tumorbiologischen Effekte vielleicht ebenso durch die Regulation spezifischer mRNAs wie dem Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) [9]. Dieser wurde bisher in Verbindung zu mehreren Schritten in der Karzinogenese gebracht [85] und es wurden zusätzliche Einflüsse im KRK auf Zellelongation, -migration und -invasivität aufgezeigt [46].

Eine weitere interessante Verbindung besteht zu dem Transkriptionsfaktor c-Myc, der an der Zellzykluskontrolle, Apoptose, Proteinbiosynthese und Zelladhäsion beteiligt ist [20]. c-Myc kann die Expression von hnRNPA1 hochregulieren [21, 34, 34] und es besteht die Möglichkeit, dass c-Myc und die *KRAS*-Mutation synergistische Effekte auf die hnRNPA1-Expression im KRK aufweisen. Unterstützt wird diese Aussage durch die gefundene signifikante Korrelation zwischen der hnRNPA1-Expression und verschiedenen klinisch-pathologischen Patientencharakteristiken, wie z.B. der Tumorlokalisation, der T-Kategorie und dem Tumorstadium nach UICC. Die Expression von hnRNPA1 scheint sich mit dem lokalen Tumorwachstum zu erhöhen und mag vielleicht zu einem aggressiveren Phänotyp führen. Darüber hinaus zeigte sich die Expression von hnRNPA1 in unseren Untersuchungen als ein unabhängiger Prognosemarker für ein schlechteres Patientenüberleben (HR 1,319; 95% CI: 1,006-1,729; p-Wert 0,045).

Zusammengenommen zeigen die hier dargestellten Daten eine Korrelation zwischen zytoplasmatischer Expression von hnRNPA1 und dem *KRAS*-Genotyp sowie eine vermehrte Expression in rechtsseitigen KRKs auf. Zudem scheint hnRNPA1 ein unabhängiger negativer Prädiktor für das Patientenüberleben zu sein.

YY1AP1 ist ein Koaktivator von YY1, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der mit YY1 im Nukleus lokalisiert ist [82]. YY1 agiert als transkriptioneller Aktivator oder Repressor, abhängig von seinen Interaktionen und seinem Zusammenspiel mit spezifischen Chromatinregionen, die histonmodifizierende Elemente besitzen [25, 34, 89]. Zhao et al. schlugen kürzlich YY1AP1 als Treiber-Onkogen in EpCAM<sup>+</sup>/AFP<sup>+</sup> humanen hepatozellulären Karzinomen vor und suggerierten, dass eine erhöhte YY1AP1-Expression zu einer Rekrutierung von histonmodifizierenden Proteinen führt, was wiederum in einer Alteration des Chromatins resultiert und somit Stammzell-verwandte Gene, die für das Tumorwachstum essentiell sind, aktiviert [89]. EpCAM ist ein transmembranäres Protein, das nur in Tumorgewebe wie KRK, Mamma- und Lungenkarzinomen überexprimiert wird [18]. Eine

weitere Studie zeigte, dass ein *Knockdown* von EpCAM in Mammakarzinomen zu einer Herabregulierung von unter anderem des RAS-MAPK-Signalweges führt und somit Tumorwachstum und Metastasierungen inhibiert [33]. Zusätzlich wurde für YY1AP1 beschrieben, die Transkription von *c-myc* [70, 82] und *p53* [82] zu aktivieren, beides sind relevante Gene in der Karzinogenese des KRK [58]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten auf eine herabgesetzte transkriptionelle Expression von YY1AP1 in *KRAS*-mutierten KRKs hin. Zudem weist eine distinkte immunhistochemische basolaterale Plasmamembranfärbung von YY1AP1/GON4L in *KRAS*-mutierten KRKs auf eine *KRAS*-abhängige Funktion von YY1AP1 im KRK hin. Diese Aussage wird gestützt von einer Mutationsanalyse eines exemplarischen Falls bei dem innerhalb desselben Primärtumors anhand der immunhistochemischen Färbemuster ein *KRAS*-mutiertes und ein *KRAS*-Wildtyp Areal aufgedeckt wurden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass diese Beobachtungen durch eine hohe Homologie (88%) der Proteinsequenz von YY1AP1 zu GON4L beeinträchtigt sein könnten [62]. Da derzeit kein diskriminierender Antikörper kommerziell erhältlich ist, ist eine Differenzierung zwischen beiden Proteinen auf translationaler Ebene zurzeit nicht möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass GON4L auf transkriptioneller Ebene keine Veränderungen aufweist. Daraus leiten wir die Vermutung ab, dass die *KRAS*-abhängige differentielle Expression überwiegend auf *YY1AP1* zurückzuführen ist, und in Nachfolgestudien bestätigt werden muss. Interessanterweise ist YY1AP1/GON4L im nicht neoplastischen Gewebe primär im Nukleus lokalisiert, während es beim KRK auch eine heterogene plasmamembranäre Lokalisation zeigt. Da RAS und EpCAM ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert sind, ist ein tumorbiologischer Effekt von YY1AP1/GON4L auch von seiner subzellulären Lokalisation abhängig und ein Zusammenspiel mit den oben genannten Proteinen möglich.

PLEKHA2 und dessen Homolog PLEKHA1 binden spezifisch an PIs), welche von PI3K produziert werden und an die Plasmamembran rekrutiert werden [22, 54]. PLEKHA2 zeigt eine Affinität zu PI(3,4)P2 [44, 49] und PI(3,4,5)P3 [44]. Phosphoinositide sind bekannt für ihre Rolle in der Zellstimulation und der onkogenen Transformation [22]. PI(3,4,5)P3 scheint zudem durch ein “*downstream signaling*” des PI3K-Signalweges involviert zu sein. Dabei rekrutiert es PDK1 und Akt (Protoonkogen) durch seine PH-Domäne an die Plasmamembran. Die hier dargestellten Daten zeigen eine verminderte Expression von PLEKHA2 in *KRAS*-mutierten KRKs auf transkriptioneller Ebene. Dies korreliert mit einer erhöhten translationalen Expression in linksseitigen KRKs, welche mit einer geringen Häufigkeit bei *KRAS*-Mutationen



auftreten (siehe oben). Hier zeigen PLEKHA2 und hnRNPA1 also gegensätzliche Phänotypen. Des Weiteren korrelierte die PLEKHA2-Expression invers mit dem lokalen Tumorwachstum, dem Nodalstatus, der Lymphgefäßinvasion und dem Tumorstadium nach UICC. Der angenommene Tumorsuppressor-Regulationsmechanismus hinter diesen Beobachtungen sollte in weiteren Studien tiefergehend untersucht werden. PLEKHA2 mag vielleicht ebenfalls im Ras/PI3K/PTEN/Akt-Signalweg durch die PIs eine Rolle spielen. Es fand sich eine geringere tumorspezifische Fünf-Jahres-Überlebensrate PLEKHA2-negativer KRKs, ein weiterer Hinweis auf eine mögliche tumorsuppressive Wirkung.

Interessanterweise zeigte ein junges Patientenalter eine signifikante Korrelation mit der nuklearen PLEKHA2-Expression im KRK. In der Literatur wird ein jüngeres Patientenalter mit weiter fortgeschrittenen und aggressiveren Tumoren assoziiert [1, 39, 51, 61], trotzdem wird die Beeinflussung des Patientenalters auf das Überleben selbst in KRKs noch immer kontrovers diskutiert [61]. Abschließend scheint ein lokalisationsabhängiger tumorbiologischer Effekt von PLEKHA2 möglich.

Zusammenfassend bestätigt diese Studie die Effekte der *KRAS*-Mutation auf das Transkriptom des KRK. Es wurden drei Gene (*hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1API*) mit bimodalen transkriptionellen Expressionsmustern im KRK auf translationaler Ebene untersucht und eine tumorbiologische Signifikanz für *hnRNPA1* und *PLEKHA2* bestätigt. Interessanterweise stellte sich die plasmamembranäre Expression von *hnRNPA1* als unabhängiger prognostischer Marker des Patientenüberlebens dar, sodass weitere Studien hierzu eingeleitet werden sollten.

## 6 Zusammenfassung

Dreißig bis fünfzig Prozent der kolorektalen Karzinome (KRK) weisen eine *KRAS*-Mutation auf. In der palliativen Therapiesituation profitieren nur Patienten mit einem *KRAS*-Wildtyp von einer zielgerichteten Therapie mit Antikörpern gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). In dieser Studie wurde versucht Einblicke in die *KRAS*-abhängige Tumorbiologie von KRKs zu erhalten. Dazu wurde das Genexpressionsprofil von *KRAS*-mutierten mit *KRAS*-Wildtyp Tumoren verglichen. Nachfolgende Validierungsstudien untersuchten auf translationaler Ebene die potentielle tumorbiologische Bedeutung einer Auswahl differentiell exprimierter Gene.

Die differentielle Expression wurde zunächst mit Gene arrays und quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion anhand acht *KRAS*-mutierter und acht *KRAS*-Wildtyp KRKs untersucht. Es folgte die immunhistochemische Färbung eines Studienkollektivs von insgesamt 1786 KRK-Fällen anhand von Großflächenschnitten und *tissue micro arrays* (TMAs).

48 Genes zeigten in den Gene arrays eine bimodale, transkriptionelle Expression zwischen *KRAS*-mutierten und *KRAS*-Wildtyp KRKs. Mit Hilfe einer Literaturrecherche wurden *hnRNPA1*, *PLEKHA2* und *YY1AP1* für weitere Validierungsstudien ausgewählt. Mittels Immunohistochemie konnten hnRNPA1, PLEKHA2 und YY1AP1 in verschiedenen zellulären Kompartimenten wie dem Zellkern, dem Zytoplasma und der Plasmamembran von KRKs nachgewiesen werden. Die hnRNPA1-Expression korrelierte mit dem *KRAS*-Genotyp, der Tumorlokalisation, der T-Kategorie und dem Tumorstadium. PLEKHA2 korrelierte mit der Tumorlokalisation, dem lokalen Tumorwachstum, der Lymphgefäßinvasion, dem Alter, dem Tumorstadium und dem Tumorgrading. Eine univariate Überlebensanalyse wies ein reduziertes Fünf-Jahres-Überleben für hnRNPA1- und ein besseres Überleben für PLEKHA2-positive KRKs nach. Interessanterweise war hnRNPA1 ein unabhängiger Prognosemarker für das Patientenüberleben.

Diese Daten bestätigen den Effekt des *KRAS*-Genotyps auf das Genexpressionsprofil von KRKs. Zudem konnten die differentiell regulierten Gene mit diversen klinisch-pathologischen Patientenparametern korreliert und in Zusammenhang mit der Tumorbiologie sowie dem Patientenüberleben gebracht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Adams, J., Audisio, R. A., White, M., and Forman, D. 2004. Age-related variations in progression of cancer at diagnosis and completeness of cancer registry data. *Surgical oncology* 13, 4, 175–179.
- [2] Andreyev, H. J., Norman, A. R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B. R., Iacopetta, B. J., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N., Beranek, M., Jandik, P., Benamouzig, R., Jullian, E., Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Muller, O., Hoffmann, I., Rabes, H. M., Zietz, C., Troungos, C., Valavanis, C., Yuen, S. T., Ho, J. W., Croke, C. T., O'Donoghue, D. P., Giaretti, W., Rapallo, A., Russo, A., Bazan, V., Tanaka, M., Omura, K., Azuma, T., Ohkusa, T., Fujimori, T., Ono, Y., Pauly, M., Faber, C., Glaesener, R., Goeij, A. F. de, Arends, J. W., Andersen, S. N., Lovig, T., Breivik, J., Gaudernack, G., Clausen, O. P., Angelis, P. D. de, Meling, G. I., Rognum, T. O., Smith, R., Goh, H. S., Font, A., Rosell, R., Sun, X. F., Zhang, H., Benhattar, J., Losi, L., Lee, J. Q., Wang, S. T., Clarke, P. A., Bell, S., Quirke, P., Bubb, V. J., Piris, J., Cruickshank, N. R., Morton, D., Fox, J. C., Al-Mulla, F., Lees, N., Hall, C. N., Snary, D., Wilkinson, K., Dillon, D., Costa, J., Pricolo, V. E., Finkelstein, S. D., Thebo, J. S., Senagore, A. J., Halter, S. A., Wadler, S., Malik, S., Krtolica, K., and Urosevic, N. 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *British journal of cancer* 85, 5, 692–696.
- [3] Andreyev, H. J. N., Norman, A. R., Clarke, P. A., Cunningham, D., and Oates, J. R. 1998. Kirsten ras Mutations in Patients With Colorectal Cancer. The Multicenter "RASCAL" Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 90, 9, 675–684.
- [4] Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften - Ständige Kommission Leitlinien. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. *AWMF-Regelwerk "Leitlinien", Januar 2019 Version 2.1*].
- [5] Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J., and Kim, J. 2012. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 13, 10, 12153–12168.
- [6] Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X. F. 2001. Ras activation of the Raf kinase. Tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research* 56, 127–155.

- [7] Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., and Baskin, Y. 2018. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer. A Focused Review of Literature. *Gastroenterology research* 11, 4, 264–273.
- [8] Benedix, F., Meyer, F., Kube, R., Gastinger, I., and Lippert, H. 2010. Karzinome des rechten und linken Kolons - verschiedene Tumorentitäten? *Zentralblatt fur Chirurgie* 135, 4, 312–317.
- [9] Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A.-C., and Vagner, S. 2005. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *The Journal of biological chemistry* 280, 6, 4144–4153.
- [10] Bosman, F. T. 2010. *WHO classification of tumours of the digestive system*. World Health Organization classification of tumours 3. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- [11] Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P., and Buscail, L. 2016. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 54, 75–83.
- [12] Caldarella, A., Crocetti, E., Messerini, L., and Paci, E. 2013. Trends in colorectal incidence by anatomic subsite from 1985 to 2005. A population-based study. *International journal of colorectal disease* 28, 5, 637–641.
- [13] Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)* 296, 5573, 1655–1657.
- [14] Carpenter, B., MacKay, C., Alnabulsi, A., MacKay, M., Telfer, C., Melvin, W. T., and Murray, G. I. 2006. The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochimica et biophysica acta* 1765, 2, 85–100.
- [15] Castellano, E. and Downward, J. 2011. RAS Interaction with PI3K. More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* 2, 3, 261–274.
- [16] Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., and Ward, E. 2009. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 59, 6, 366–378.
- [17] Center, M. M., Jemal, A., and Ward, E. 2009. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the*

*American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 6, 1688–1694.

- [18] Chai, X. B., Song, R. F., and Xu, F. 2015. Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis. *Genetics and molecular research : GMR* 14, 3, 7624–7629.
- [19] Chang, Y.-Y., Lin, P.-C., Lin, H.-H., Lin, J.-K., Chen, W.-S., Jiang, J.-K., Yang, S.-H., Liang, W.-Y., and Chang, S.-C. 2016. Mutation spectra of RAS gene family in colorectal cancer. *American journal of surgery*.
- [20] Chen, B.-J., Wu, Y.-L., Tanaka, Y., and Zhang, W. 2014. Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *International journal of biological sciences* 10, 10, 1084–1096.
- [21] Chen, M., Zhang, J., and Manley, J. L. 2010. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. *Cancer research* 70, 22, 8977–8980.
- [22] Costantini, J. L., Cheung, S. M. S., Hou, S., Li, H., Kung, S. K., Johnston, J. B., Wilkins, J. A., Gibson, S. B., and Marshall, A. J. 2009. TAPP2 links phosphoinositide 3-kinase signaling to B-cell adhesion through interaction with the cytoskeletal protein utrophin: expression of a novel cell adhesion-promoting complex in B-cell leukemia. *Blood* 114, 21, 4703–4712.
- [23] Cox, A. D., Der, C. J., and Philips, M. R. 2015. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 8, 1819–1827.
- [24] Crews, C. M. and Erikson, R. L. 1993. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation. What to Mek of it all. *Cell* 74, 2, 215–217.
- [25] Cuddapah, S., Schones, D. E., Cui, K., Roh, T. Y., Barski, A., Wei, G., Rochman, M., Bustin, M., and Zhao, K. 2011. Genomic Profiling of HMGN1 Reveals an Association with Chromatin at Regulatory Regions<sup>▽</sup>. *Molecular and Cellular Biology* 31, 4, 700–709.
- [26] Davis, D. M., Marcet, J. E., Frattini, J. C., Prather, A. D., Mateka, J. J. L., and Nfonsam, V. N. 2011. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *Journal of the American College of Surgeons* 213, 3, 352–361.

- [27] Di Magliano, M. P. and Logsdon, C. D. 2013. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology* 144, 6, 1220–1229.
- [28] Doubeni, C. A., Laiyemo, A. O., Major, J. M., Schootman, M., Lian, M., Park, Y., Graubard, B. I., Hollenbeck, A. R., and Sinha, R. 2012. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer. An analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 118, 14, 3636–3644.
- [29] Douillard, J.-Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocakova, I., Ruff, P., Blasinska-Morawiec, M., Smakal, M., Canon, J.-L., Rother, M., Oliner, K. S., Wolf, M., and Gansert, J. 2010. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 31, 4697–4705.
- [30] Fabian, J. R., Vojtek, A. B., Cooper, J. A., and Morrison, D. K. 1994. A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 13, 5982–5986.
- [31] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, and Bray, F. 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.*
- [32] Frank, S. A. 2003. Somatic Mutation. Early Cancer Steps Depend on Tissue Architecture. *Current Biology* 13, 7, R261-R263.
- [33] Gao, J., Liu, X., Yang, F., Liu, T., Yan, Q., and Yang, X. 2015. By inhibiting Ras/Raf/ERK and MMP-9, knockdown of EpCAM inhibits breast cancer cell growth and metastasis. *Oncotarget* 6, 29, 27187–27198.
- [34] Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., and Bonavida, B. 2006. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25, 8, 1125–1142.

- [35] Guil, S., Long, J. C., and Caceres, J. F. 2006. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Molecular and Cellular Biology* 26, 15, 5744–5758.
- [36] Hahn, J.-M. 2013. *Checkliste Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [37] Hauser, H., Zitt, M., Berger, A., Herbst, F., Heuberger, A., Klimpfinger, M., ... & Teleky, B. 2010. Kolorektales Karzinom. *Journal für gastroenterologische und hepatologische Erkrankungen* 8, 2, 42–59.
- [38] He, Y. and Smith, R. 2009. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 7, 1239–1256.
- [39] Hemminki, K., Santi, I., Weires, M., Thomsen, H., Sundquist, J., and Bermejo, J. L. 2010. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC cancer* 10, 688.
- [40] Herold, G. 2012. *Innere Medizin 2012. Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Herold, Köln.
- [41] Hong, S., Kim, S., Kim, H. Y., Kang, M., Jang, H. H., and Lee, W.-S. 2016. Targeting the PI3K signaling pathway in KRAS mutant colon cancer. *Cancer medicine* 5, 2, 248–255.
- [42] Hurwitz, H. I., Tan, B. R., Reeves, J. A., Xiong, H., Somer, B., Lenz, H.-J., Hochster, H. S., Scappaticci, F., Palma, J. F., Price, R., Lee, J. J., Nicholas, A., Sommer, N., and Bendell, J. 2018. Phase II Randomized Trial of Sequential or Concurrent FOLFOXIRI-Bevacizumab Versus FOLFOX-Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer (STEAM). *The oncologist*.
- [43] Jass, J. R., Do, K. A., Simms, L. A., Iino, H., Wynter, C., Pillay, S. P., Searle, J., Radford-Smith, G., Young, J., and Leggett, B. 1998. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 42, 5, 673–679.
- [44] Jungmichel, S., Sylvestersen, K. B., Choudhary, C., Nguyen, S., Mann, M., and Nielsen, M. L. 2014. Specificity and commonality of the phosphoinositide-binding proteome analyzed by quantitative mass spectrometry. *Cell reports* 6, 3, 578–591.
- [45] Kim, M.-J., Lee, H. S., Kim, J. H., Kim, Y. J., Kwon, J. H., Lee, J.-O., Bang, S.-M., Park, K. U., Kim, D.-W., Kang, S.-B., Kim, J.-S., Lee, J. S., and Lee, K.-W. 2012.

- Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. *BMC cancer* 12, 347.
- [46] Knuchel, S., Anderle, P., Werfelli, P., Diamantis, E., and Ruegg, C. 2015. Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact-dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin alphavbeta5-mediated adhesion. *Oncotarget* 6, 16, 14300–14317.
- [47] Lasota, J., Kowalik, A., Felisiak-Golabek, A., Inaguma, S., Wang, Z.-F., Pięciak, L., Zięba, S., Pęksa, R., Kopczynski, J., Okoń, K., Waloszczyk, P., Gozdz, S., Biernat, W., and Miettinen, M. 2017. SP174, NRAS Q61R Mutant-Specific Antibody, Cross-React With KRAS Q61R Mutant Protein in Colorectal Carcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* 141, 4, 564–568.
- [48] Lee, G. H., Malietzis, G., Askari, A., Bernardo, D., Al-Hassi, H. O., and Clark, S. K. 2015. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 41, 3, 300–308.
- [49] Li, H., Hou, S., Wu, X., Nandagopal, S., Lin, F., Kung, S., and Marshall, A. J. 2013. The tandem PH domain-containing protein 2 (TAPP2) regulates chemokine-induced cytoskeletal reorganization and malignant B cell migration. *PloS one* 8, 2, e57809.
- [50] Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., and Chng, W.-J. 2015. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World journal of gastroenterology* 21, 1, 84–93.
- [51] Lincourt, A. E., Sing, R. F., Kercher, K. W., Stewart, A., Demeter, B. L., Hope, W. W., Lang, N. P., Greene, and Heniford, B. T. 2008. Association of demographic and treatment variables in long-term colon cancer survival. *Surgical innovation* 15, 1, 17–25.
- [52] Ma, Y.-L., Peng, J.-Y., Zhang, P., Huang, L., Liu, W.-J., Shen, T.-Y., Chen, H.-Q., Zhou, Y.-K., Zhang, M., Chu, Z.-X., and Qin, H.-L. 2009. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology. *Journal of proteome research* 8, 10, 4525–4535.
- [53] Maksimović, S. 2007. Duzina prezivljanja bolesnika sa mucinoznim adenokarcinomom kolorektuma. *Medicinski arhiv* 61, 1, 26–29.



- [54] Marshall, A. J., Krahn, A. K., Ma, K., Duronio, V., and Hou, S. 2002. TAPP1 and TAPP2 are targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in B cells: sustained plasma membrane recruitment triggered by the B-cell antigen receptor. *Molecular and Cellular Biology* 22, 15, 5479–5491.
- [55] McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., and Franklin, R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 8, 1263–1284.
- [56] Michael Walter Pfaffl, Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 10, 1, 92–95.
- [57] Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., and Wolfman, A. 1993. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science (New York, N.Y.)* 260, 5114, 1658–1661.
- [58] Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., Dinh, H. H., Drummond, J. A., Fowler, G., Kovar, C. L., Lewis, L. R., Morgan, M. B., Newsham, I. F., Reid, J. G., Santibanez, J., Shinbrot, E., Trevino, L. R., Wu, Y.-Q., Wang, M., Gunaratne, P., Donehower, L. A., Creighton, C. J., Wheeler, D. A., Gibbs, R. A., Lawrence, M. S., Voet, D., Jing, R., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Stojanov, P., McKenna, A., Lander, E. S., Gabriel, S., Getz, G., Ding, L., Fulton, R. S., Koboldt, D. C., Wylie, T., Walker, J., Dooling, D. J., Fulton, L., Delehaunty, K. D., Fronick, C. C., Demeter, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Chu, A., Chun, H.-J. E., Mungall, A. J., Pleasance, E., Gordon Robertson, A., Stoll, D., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y. S. N., Chuah, E., Coope, R. J. N., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R. A., Lee, D., Li, H. I., Mayo, M., Moore, R. A., Schein, J. E., Slobodan, J. R., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R., Zeng, T., Zhao, Y., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Bass, A. J., Ramos, A. H., Saksena, G., Cherniack, A. D., Schumacher, S. E., Tabak, B., Carter, S. L., Pho, N. H., Nguyen, H., Onofrio, R. C., Crenshaw, A., Ardlie, K., Beroukhi, R., Winckler, W., Meyerson, M., Protopopov, A., Zhang, J., Hadjipanayis, A., Lee, E., Xi, R., Yang, L., Ren, X., Zhang, H., Sathiamoorthy, N., Shukla, S., Chen, P.-C., Haseley, P., Xiao, Y., Lee, S., Seidman, J., Chin, L., Park, P. J., Kucherlapati, R., Todd Auman, J., Hoadley, K. A., Du, Y.,

Wilkerson, M. D., Shi, Y., Liquori, C., Meng, S., Li, L., Turman, Y. J., Topal, M. D., Tan, D., Waring, S., Buda, E., Walsh, J., Jones, C. D., Mieczkowski, P. A., Singh, D., Wu, J., Gulabani, A., Dolina, P., Bodenheimer, T., Hoyle, A. P., Simons, J. V., Soloway, M., Mose, L. E., Jefferys, S. R., Balu, S., Oâ€™Connor, B. D., Prins, J. F., Chiang, D. Y., Neil Hayes, D., Perou, C. M., Hinoue, T., Weisenberger, D. J., Maglinte, D. T., Pan, F., Berman, B. P., van den Berg, D. J., Shen, H., Triche Jr, T., Baylin, S. B., Laird, P. W., Noble, M., Voet, D., Gehlenborg, N., DiCara, D., Wu, C.-J., Yingchun Liu, S., Zhou, L., Lin, P., Park, R. W., Nazaire, M.-D., Robinson, J., Thorvaldsdottir, H., Mesirov, J., Thorsson, V., Reynolds, S. M., Bernard, B., Kreisberg, R., Lin, J., Iype, L., Bressler, R., ErkkilÃ¤, T., Gundapuneni, M., Liu, Y., Norberg, A., Robinson, T., Yang, D., Zhang, W., Shmulevich, I., Ronde, J. J. de, Schultz, N., Cerami, E., Ciriello, G., Goldberg, A. P., Gross, B., Jacobsen, A., Gao, J., Kaczkowski, B., Sinha, R., Arman Aksoy, B., Antipin, Y., Reva, B., Shen, R., Taylor, B. S., Chan, T. A., Ladanyi, M., Sander, C., Akbani, R., Zhang, N., Broom, B. M., Casasent, T., Unruh, A., Wakefield, C., Hamilton, S. R., Craig Cason, R., Baggerly, K. A., Weinstein, J. N., Haussler, D., Benz, C. C., Stuart, J. M., Benz, S. C., Zachary Sanborn, J., Vaske, C. J., Zhu, J., Szeto, C., Scott, G. K., Yau, C., Ng, S., Goldstein, T., Ellrott, K., Collisson, E., Cozen, A. E., Zerbino, D., Wilks, C., Craft, B., Spellman, P., Penny, R., Shelton, T., Hatfield, M., Morris, S., Yena, P., Shelton, C., Sherman, M., Paulauskis, J., Gastier-Foster, J. M., Bowen, J., Ramirez, N. C., Black, A., Pyatt, R., Wise, L., White, P., Bertagnolli, M., Brown, J., Chu, G. C., Czerwinski, C., Denstman, F., Dhir, R., DÃ¶rner, A., Fuchs, C. S., Guillem, J. G., Iacocca, M., Juhl, H., Kaufman, A., Kohl III, B., van Le, X., Mariano, M. C., Medina, E. N., Meyers, M., Nash, G. M., Paty, P. B., Petrelli, N., Rabeno, B., Richards, W. G., Solit, D., Swanson, P., Temple, L., Tepper, J. E., Thorp, R., Vakiani, E., Weiser, M. R., Willis, J. E., Witkin, G., Zeng, Z., Zinner, M. J., Zornig, C., Jensen, M. A., Sfeir, R., Kahn, A. B., Chu, A. L., Kothiyal, P., Wang, Z., Snyder, E. E., Pontius, J., Pihl, T. D., Ayala, B., Backus, M., Walton, J., Whitmore, J., Baboud, J., Berton, D. L., Nicholls, M. C., Srinivasan, D., Raman, R., Girshik, S., Kigonya, P. A., Alonso, S., Sanbhadi, R. N., Barletta, S. P., Greene, J. M., Pot, D. A., Mills Shaw, K. R., Dillon, L. A. L., Buetow, K., Davidsen, T., Demchok, J. A., Eley, G., Ferguson, M., Fielding, P., Schaefer, C., Sheth, M., Yang, L., Guyer, M. S., Ozenberger, B. A., Palchik, J. D., Peterson, J., Sofia, H. J., and Thomson, E. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330 EP -.

- [59] Nash, G. M., Gimbel, M., Shia, J., Nathanson, D. R., Ndubuisi, M. I., Zeng, Z.-S., Kemeny, N., and Paty, P. B. 2010. KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases. *Annals of surgical oncology* 17, 2, 572–578.
- [60] Network, T. C. G. A. R., McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., van Meir, E. G., Brat, D. J., M. Mastrogiannakis, G., Olson, J. J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., Alfred Yung, W. K., Bogler, O., VandenBerg, S., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., Sabo, A., Nazareth, L., Lewis, L., Hall, O., Zhu, Y., Ren, Y., Alvi, O., Yao, J., Hawes, A., Jhangiani, S., Fowler, G., San Lucas, A., Kovar, C., Cree, A., Dinh, H., Santibanez, J., Joshi, V., Gonzalez-Garay, M. L., Miller, C. A., Milosavljevic, A., Donehower, L., Wheeler, D. A., Gibbs, R. A., Cibulskis, K., Sougnez, C., Fennell, T., Mahan, S., Wilkinson, J., Ziaugra, L., Onofrio, R., Bloom, T., Nicol, R., Ardlie, K., Baldwin, J., Gabriel, S., Lander, E. S., Ding, L., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Wallis, J., Larson, D. E., Shi, X., Abbott, R., Fulton, L., Chen, K., Koboldt, D. C., Wendl, M. C., Meyer, R., Tang, Y., Lin, L., Osborne, J. R., Dunford-Shore, B. H., Miner, T. L., Delehaunty, K., Markovic, C., Swift, G., Courtney, W., Pohl, C., Abbott, S., Hawkins, A., Leong, S., Haippek, C., Schmidt, H., Wiechert, M., Vickery, T., Scott, S., Dooling, D. J., Chinwalla, A., Weinstock, G. M., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Getz, G., Winckler, W., Verhaak, R. G. W., Lawrence, M. S., Oâ€™Kelly, M., Robinson, J., Alexe, G., Beroukhi, R., Carter, S., Chiang, D., Gould, J., Gupta, S., Korn, J., Mermel, C., Mesirov, J., Monti, S., Nguyen, H., Parkin, M., Reich, M., Stransky, N., Weir, B. A., Garraway, L., Golub, T., Meyerson, M., Chin, L., Protopopov, A., Zhang, J., Perna, I., Aronson, S., Sathiamoorthy, N., Ren, G., Yao, J., Wiedemeyer, W. R., Kim, H., Won Kong, S., Xiao, Y., Kohane, I. S., Seidman, J., Park, P. J., Kucherlapati, R., Laird, P. W., Cope, L., Herman, J. G., Weisenberger, D. J., Pan, F., van den Berg, D., van Neste, L., Mi Yi, J., Schuebel, K. E., Baylin, S. B., Absher, D. M., Li, J. Z., Southwick, A., Brady, S., Aggarwal, A., Chung, T., Sherlock, G., Brooks, J. D., Myers, R. M., Spellman, P. T., Purdom, E., Jakkula, L. R., Lapuk, A. V., Marr, H., Dorton, S., Gi Choi, Y., Han, J., Ray, A., Wang, V., Durinck, S., Robinson, M., Wang, N. J., Vranizan, K., Peng, V., van Name, E., Fontenay, G. V., Ngai, J., Conboy, J. G., Parvin, B., Feiler, H. S., Speed, T. P., Gray, J. W., Brennan, C., Socci, N. D., Olshen, A., Taylor, B. S., Lash, A., Schultz, N., Reva, B., Antipin, Y., Stukalov, A., Gross, B., Cerami, E., Qing Wang, W., Qin, L.-X., Seshan, V. E., Villafania, L., Cavatore, M., Borsu, L., Viale, A., Gerald, W., Sander, C.,

- Ladanyi, M., Perou, C. M., Neil Hayes, D., Topal, M. D., Hoadley, K. A., Qi, Y., Balu, S., Shi, Y., Wu, J., Penny, R., Bittner, M., Shelton, T., Lenkiewicz, E., Morris, S., Beasley, D., Sanders, S., Kahn, A., Sfeir, R., Chen, J., Nassau, D., Feng, L., Hickey, E., Zhang, J., Weinstein, J. N., Barker, A., Gerhard, D. S., Vockley, J., Compton, C., Vaught, J., Fielding, P., Ferguson, M. L., Schaefer, C., Madhavan, S., Buetow, K. H., Collins, F., Good, P., Guyer, M., Ozenberger, B., Peterson, J., and Thomson, E. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061 EP -.
- [61] O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Liu, J. H., Etzioni, D. A., and Ko, C. Y. 2004. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Diseases of the colon and rectum* 47, 12, 2064–2069.
- [62] Ohtomo, T., Horii, T., Nomizu, M., Suga, T., and Yamada, J. 2007. Molecular cloning of a structural homolog of YY1AP, a coactivator of the multifunctional transcription factor YY1. *Amino acids* 33, 4, 645–652.
- [63] Omranipour, R., Doroudian, R., and Mahmoodzadeh, H. 2012. Anatomical distribution of colorectal carcinoma in Iran. A retrospective 15-yr study to evaluate rightward shift. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13, 1, 279–282.
- [64] Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H., and Stephenson, J. R. 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 14, 4218–4222.
- [65] Roock, W. de, Piessevaux, H., Schutter, J. de, Janssens, M., Hertogh, G. de, Personeni, N., Biesmans, B., van Laethem, J.-L., Peeters, M., Humblet, Y., van Cutsem, E., and Tejpar, S. 2008. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19, 3, 508–515.
- [66] Roux, P. P. and Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases. A family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 2, 320–344.

- [67] Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Velculescu, V. E. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)* 304, 5670, 554.
- [68] Santini, D., Loupakis, F., Vincenzi, B., Floriani, I., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Maltese, P. E., Andreoni, F., Masi, G., Graziano, F., Baldi, G. G., Salvatore, L., Russo, A., Perrone, G., Tommasino, M. R., Magnani, M., Falcone, A., Tonini, G., and Ruzzo, A. 2008. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *The oncologist* 13, 12, 1270–1275.
- [69] Seydaoglu, G., Ozer, B., Arpaci, N., Parsak, C. K., and Eray, I. C. 2013. Trends in colorectal cancer by subsite, age, and gender over a 15-year period in Adana, Turkey. 1993-2008. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 24, 6, 521–531.
- [70] Shrivastava, A. and Calame, K. 1994. An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucl Acids Res* 22, 24, 5151–5155.
- [71] Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 1, 7–30.
- [72] Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., Sestini, R., Cianchi, F., Valanzano, R., Nobili, S., Mini, E., Pazzagli, M., and Orlando, C. 2008. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *American journal of clinical pathology* 130, 2, 247–253.
- [73] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., and Wittekind, C. 2009. *TNM classification of malignant tumours*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ.
- [74] Stanley R. Hamilton, M. D. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. World Health Organization Classification of Tumours.
- [75] Stintzing, S., Heinemann, V., Moosmann, N., Hiddemann, W., Jung, A., and Kirchner, T. 2009. The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies. The importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. *Deutsches Arzteblatt international* 106, 12, 202–206.
- [76] Therkildsen, C., Bergmann, T. K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S., and Nilbert, M. 2014. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR

- treatment in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 53, 7, 852–864.
- [77] Toyoda, Y., Nakayama, T., Ito, Y., Ioka, A., and Tsukuma, H. 2009. Trends in colorectal cancer incidence by subsite in Osaka, Japan. *Japanese journal of clinical oncology* 39, 3, 189–191.
- [78] van Cutsem, E., Lenz, H.-J., Kohne, C.-H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezinek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., van Krieken, J. H., and Ciardiello, F. 2015. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33, 7, 692–700.
- [79] van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Krainer, A. R., Moscat, J., and Caceres, J. F. 2000. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *The Journal of cell biology* 149, 2, 307–316.
- [80] Vivanco, I. and Sawyers, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* 2, 7, 489–501.
- [81] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 319, 9, 525–532.
- [82] Wang, C.-Y., Liang, Y.-J., Lin, Y.-S., Shih, H.-M., Jou, Y.-S., and Yu, W. C. Y. 2004. YY1AP, a novel co-activator of YY1. *The Journal of biological chemistry* 279, 17, 17750–17755.
- [83] Wang, Y., Velho, S., Vakiani, E., Peng, S., Bass, A. J., Chu, G. C., Gierut, J., Bugni, J. M., Der, C. J., Philips, M., Solit, D. B., and Haigis, K. M. 2013. Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. *Cancer discovery* 3, 3, 294–307.
- [84] Warneke, V. S., Behrens, H.-M., Haag, J., Balschun, K., Boger, C., Becker, T., Ebert, M. P. A., Lordick, F., and Rocken, C. 2013. Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 22, 3, 127–137.

- [85] Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E. M. 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *The Biochemical journal* 437, 2, 199–213.
- [86] Xodo, L., Paramasivam, M., Membrino, A., and Cogoi, S. 2008. Protein hnRNPA1 binds to a critical G-rich element of KRAS and unwinds G-quadruplex structures: implications in transcription. *Nucleic acids symposium series (2004)*, 52, 159–160.
- [87] Yao, Y.-M. M., Donoho, G. P., Iversen, P. W., Zhang, Y., van Horn, R. D., Forest, A., Novosiadly, R. D., Webster, Y. W., Ebert, P., Bray, S., Ting, J. C., Aggarwal, A., Henry, J. R., Tiu, R. V., Plowman, G. D., and Peng, S.-B. 2017. Mouse PDX Trial Suggests Synergy of Concurrent Inhibition of RAF and EGFR in Colorectal Cancer with BRAF or KRAS Mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23, 18, 5547–5560.
- [88] Yurgelun, M. B., Kulke, M. H., Fuchs, C. S., Allen, B. A., Uno, H., Hornick, J. L., Ukaegbu, C. I., Brais, L. K., McNamara, P. G., Mayer, R. J., Schrag, D., Meyerhardt, J. A., Ng, K., Kidd, J., Singh, N., Hartman, A.-R., Wenstrup, R. J., and Syngal, S. 2017. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35, 10, 1086–1095.
- [89] Zhao, X., Parpart, S., Takai, A., Roessler, S., Budhu, A., Yu, Z., Blank, M., Zhang, Y. E., Jia, H.-L., Ye, Q.-H., Qin, L.-X., Tang, Z.-Y., Thorgeirsson, S. S., and Wang, X. W. 2015. Integrative genomics identifies YY1AP1 as an oncogenic driver in EpCAM(+) AFP(+) hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 34, 39, 5095–5104.


## 8 Anhang


\* Legende zu den Tabelle 5, 6 und 8:

- p (1) Fishers Exact
- p(2) Kendall's tau b (Exakte Sig.)
- p(3) Kendall's tau b (Monte Carlo Signifikanz, da bei insuffizienten Daten keine exakte Sig. berechnet werden kann)
- p(4) Log Rank (Mantel Cox)

\*1 Es konnte keine Statistik berechnet werden

\*2 Lebend or Nicht-Tumor bedingter Tod

 Signifikanz nach multiple Testing

 Signifikanzverlust nach multiple Testing



## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die mich bei der Anfertigung und Vollendung dieser Promotion unterstützen und ermöglichen.

An erster Stelle möchte meinem Doktorvater, Herrn Professor Christoph Röcken, Direktor und Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, danken. Professor Röcken stellte mir dieses spannende Thema und die passenden Räumlichkeiten zur Verfügung und stand mir stets mit neuen Denkansätzen, konstruktiver Kritik und zahlreichen Hilfestellungen zur Seite.

Mit immer neuen Ideen und bei technischen Fragen war Frau Sandra Krüger während der experimentellen Phase eine unverzichtbare Stütze für mich. Auch Herrn Dr. rer. medic. Hans-Michael Behrens möchte ich zutiefst für die professionelle Unterstützung im statistischem Teil dieser Arbeit danken. Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und Bereitsstellung von Vordaten möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. Nat Ann-Kathrin Wenke bedanken.

Ohne die immerwährende Unterstützung meiner Eltern Leonarda und Mario Ciavarrella wäre mein Studium und diese Promotion nie möglich gewesen und deshalb möchte ich ihnen an dieser Stelle meinen tiefsten Dank aussprechen.

Abschließend möchte ich auch meinem Mann Moritz danken, der mir stets mit motivierenden Zusprüchen zur Seite stand.