Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie, Stoffwechsel und klinische Infektiologie Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas M. Gress des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Zelluläre Rolle des Valosin-containing Protein (VCP) im kolorektalen Karzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Lisa-Maria Schmitt

aus Heidelberg

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 23.06.2023 Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner Referent: Prof. (apl.) Dr. Malte Buchholz 1. Korreferent: Prof. Dr. Jörg-Walter Bartsch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzun	gsverzeichnis	III
Abbildung	gsverzeichnis	V
Tabellenv	erzeichnis	VI
1. Einle	itung	1 -
1.1.	Kolonkarzinome	2 -
1.2.	VCP	5 -
1.3.	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	
1.4.	Zielsetzung	8 -
2. Mate	rial und Methoden	10 -
2.1.	Material	10 -
2.1.1.	Laborgeräte	10 -
2.1.2.	Material	12 -
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	14 -
2.1.4.	siRNAs	16 -
2.1.5.	Primer	17 -
2.1.6.	Kits	18 -
2.1.7.	Antikörper	19 -
2.1.8.	Puffer und Lösungen	21 -
2.1.9.	Software	24 -
2.1.10.	Zelllinien	24 -
2.2.	Methoden	25 -
2.2.1.	Zellkultur	25 -
2.2.1.1.	Auftauen von Zellen	25 -
2.2.1.2.	Kultivieren von Zellen	25 -
2.2.1.3.	Aussaat von Zellen	25 -
2.2.1.4.	Einfrieren der Zellen	25 -
2.2.2.	PEI-Transfektion	26 -
2.2.3.	Lipofectamine® RNAiMax-Transfektion	26 -
2.2.4.	MTT-Assay	26 -
2.2.5.	BrdU-Assay	27 -
2.2.6.	RNA-Isolation	27 -
2.2.7.	cDNA-Synthese	27 -
2.2.8.	qPCR	28 -
2.2.9.	Western Blot	29 -

2.2.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford	29 -
2.2.9.2	2. SDS-Gelelektrophorese	30 -
2.2.9.3	3. Blotting	31 -
2.2.9.4	4. Antikörper-Färbung	31 -
2.2.9.5	5. Detektion der Proteine	32 -
2.2.10	. γH2AX-Färbung	32 -
2.2.11	. Durchflusszytometrie	33 -
2.2.12	. Apoptose-Analyse: Annexin V-PI- Färbung	33 -
2.2.13	. Zellzyklus-Analyse: PI-Färbung	34 -
2.2.14	. Seneszenz-Analyse: SA-βGal-Färbung	35 -
2.2.15	. Auswertung und Statistik	35 -
3. Erge	ebnisse	36 -
3.1.	Etablierung der Inhibitoren	36 -
3.2.	VCP-Inhibition via CB5083 und NMS873 induzieren DNA-Schäden	37 -
3.3.	VCP-Knockdown induziert Apoptose und Nekrose	38 -
3.4.	VCP-Knockdown führt zu Proliferationsinhibition und Zellzyklusarrest	41 -
3.5.	VCP Herunterregulierung induziert Seneszenz	46 -
3.6.	VCP spielt keine Rolle bei Autophagie-Induktion in kolorektalen Karzinomzellen .	47 -
3.7.	VCP verhindert Ubiquitinierung	49 -
3.8.	VCP-Knockdown initiiert Unfolded Protein System	51 -
4. Disl	kussion	54 -
4.1.	Viabilitätsinhibition und Zellzyklusarrest durch VCP-Knockdown	55 -
4.2.	Autophagie-Induktion	57 -
4.3.	Ubiquitinierung	58 -
4.4.	Unfolded Protein Response	60 -
4.5.	Ausblick	63 -
5. Zus	ammenfassung	64 -
6. Sun	nmary	66 -
Literatur	verzeichnis	67 -
7. App	pendix	76 -
7.1.	Curriculum vitae	78 -
7.2.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	79 -
7.3.	Danksagung	80 -
7.4.	Ehrenwörtliche Erklärung	81 -

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium Persulphat
Aqua dest	Aqua destillata
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	engl.: copy DNA; komplementäre DNA
CRC	engl.: colorectal cancer; kolorektales Karzinom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FCS	engl.: fetal calf serum; fetales Kälberserum
for	engl.: forward
gDNA	genomische DNA
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
h	engl.: hour; Stunde
IBMPFD	Inclusion body myopathy Paget's disease of bone and fronotemporal dementia
KD	engl.: Knockdown
ко	engl.: Knockout
Min	Minute
MMC	Mitomycin C
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ns	nicht signifikant
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimine
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
rev	engl.: reverse
RNA	engl.: Ribonucleic Acid; Ribonukleinsäure
rpm	engl.: revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulphat
Sek	Sekunde
siRNA	engl.: small interfering RNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VCP	engl.: Valosine Containing Protein
WHO	engl.: World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: "Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkr	ankungen
in Deutschland 2018"	1 -
Abbildung 2: Progression eines Kolonkarzinoms	3 -
Abbildung 3: Vielfältige Funktionen von VCP im zellulären Kontext	6 -
Abbildung 4: Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben in Relation zu VCP-Express	sionslevel
	7 -
Abbildung 5: VCP-Expression in Kolon Adenokarzinomen	9 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ablaufs eines qPCR Zyklus	29 -
Abbildung 7: Etablierung der Inhibitoren	36 -
Abbildung 8: γH2AX-Färbung nach VCP-Inhibition	38 -
Abbildung 9: Apoptose-Analyse nach VCP-Inhibition	40 -
Abbildung 10: VCP-Inhibition hemmt Proliferation	41 -
Abbildung 11: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown	44 -
Abbildung 12: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown mittels Durchflusszytometrie	45 -
Abbildung 13: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown nach Nocodazol-induziertem	G2-Arrest
	45 -
Abbildung 14: Induktion der Seneszenz	46 -
Abbildung 15: Induktion der Autophagie	48 -
Abbildung 16: VCP inhibiert Ubiquitinierung	50 -
Abbildung 17: Induktion der UPR nach VCP-Inhibition	52 -
Abbildung 18: schematische Darstellung aller drei Wege des Unfolded Protein Systems	61 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste verwendeter Laborgeräte	12 -
Tabelle 2: Liste verwendeter Materialien	13 -
Tabelle 3: Liste verwendeter Chemikalien und Reagenzien	16 -
Tabelle 4: Liste verwendeter siRNAs	16 -
Tabelle 5: Liste verwendeter Primer	18 -
Tabelle 6: Liste verwendeter Kits	19 -
Tabelle 7: Liste verwendeter Antikörper	20 -
Tabelle 8: Liste verwendeter Puffer und Lösungen	23 -
Tabelle 9: Liste verwendeter Software	24 -
Tabelle 10: Mastermix cDNA Synthese	28 -
Tabelle 11: Mastermix qPCR	28 -
Tabelle 12: Rezepte Polyacrylamid-Gele	30 -
Tabelle 13: Durchflusszytometrie Färbeprotokolle Apoptose Analyse	34 -

1. Einleitung

2020 gab es laut World Health Organisation (WHO) ca. 10 Millionen krebsbedingte Todesfälle weltweit, das heißt einer von sechs Todesfällen wurde durch eine bösartige Krebserkrankung verursacht. Somit ist Krebs die führende Todesursache weltweit im Jahr 2020. Am häufigsten traten Mammakarzinome auf, gefolgt von Lungenkrebs und Kolon- und Rektumkarzinomen. Zum Tod führten am häufigsten Lungenkrebs, Kolon- und Rektumkarzinome und Leberkarzinome. Risikofaktoren, die ein Auftreten von Krebs begünstigen, sind laut WHO der Konsum von Tabak, Alkohol, ein zu hoher Body Mass Index, nährstoffarme Ernährung und fehlende körperliche Aktivität (WHO 2022b). In den USA wurde in den letzten 20 Jahren ein sinkender Trend der krebsbedingten Todesraten von 27% verzeichnet. Trotzdem wurden laut Centers of Disease Control and Prevention (CDC) im Jahr 2020 170,3 Todesfälle bei Männern und 124,5 Todesfälle bei Frauen auf 100 000 Einwohner verzeichnet. Der sinkende Trend ist laut CDC auf bessere Vorsorgeuntersuchungen, Impfungen und bessere Behandlungen zurückzuführen (Centers for Disease Control and Prevention 2022a). Ein ähnliches Bild zeigt sich laut Robert Koch Institut (RKI) in Deutschland. Auch in Deutschland sind die Sterberaten in den letzten zehn Jahren um 7% bei Frauen und 12% bei Männern gesunken, allerdings wurden 2018 immer noch ca. 500 000 neue Erkrankungen und 229 065 krebsbedingte Todesfälle verzeichnet (Erdmann et al. 2021).



Abbildung 1: "Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2018", aus: "Krebs in Deutschland für 2017/2018" (Erdmann et al. 2021)

Bis zum Jahr 2040 hat die WHO und die *International Agency for Research on Cancer* einen weltweiten Anstieg von 19,3 Millionen neuer Fälle auf 30,3 Millionen prognostiziert, ebenso wie eine deutliche Erhöhung der Mortalität von ca. 10 Millionen auf 16,3 Millionen krebsbedingter Todesfälle (WHO 2022a). Diese Daten machen die Dringlichkeit und Relevanz der diagnostischen und therapeutischen Krebsforschung zum besseren Verständnis und letztlich für verbesserte und zielgerichtetere Therapien deutlich.

Der zugrundeliegende Mechanismus, der für eine maligne Transformation verantwortlich ist, sind ungerichtete Mutationen und DNA-Schäden (Bertram 2000). Diese können durch externe Faktoren wie UV-Licht, γ-Strahlung, Chemikalien oder auch oxidativen Stress und Entzündungen verursacht werden. Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder einem Zellzyklus-regulierenden Gen können zu unkontrolliert proliferierenden Zellen führen (Kay et al. 2019; Basu 2018).

Ein Beispiel für Mutationen, die Proto-Onkogene in Onkogene umkehren und so die maligne Transformation fördern können, ist das Proto-Onkogen *Ras*. Das *ras* Proto-Onkogen war das erste entdeckte humane Onkogen, zu dessen Familie *Hras, Kras* und *Nras* gehören. *Ras* reguliert durch die Initiierung einer Proteinkaskade die Signaltransduktion in Zellen. Dabei werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, wodurch letztlich die Genexpression der Zielgene moduliert werden kann. Häufig sind es Punktmutationen an Position 12, 13 und 61, die dazu führen, dass Ras gegenüber der GTP-Hydrolyse resistent und somit konstitutiv aktiv wird. Die Folgen dieser dauerhaften Aktivierung sind eine erhöhte Proliferation, Inhibition der Apoptose und verschiedene Wachstums- und Überlebenssignale in der Zelle. *Ras*-Mutationen kommen in ca. 10-15% aller Tumore vor, vor allem aber in Blasen- und Nierentumoren (*Hras*), in Melanomen und hämatologischen Krebserkrankungen (*Nras*) und in Lungentumoren, Pankreas-, Kolon- und Ovarialkarzinomen (Pappou und Ahuja 2010).

1.1. Kolonkarzinome

Wie bereits erwähnt sind Kolon- und Rektumkarzinome (CRC) die dritthäufigsten Tumore und die zweittödlichsten Krebserkrankungen weltweit. 2020 machten CRC 10% der globalen Inzidenz und 9,4% aller krebsbedingten Todesfälle weltweit aus. In 2040 werden 3,2 Millionen neuer CRC Fälle prognostiziert (Xi und Xu 2021).

Das Kolon besteht aus sechs Abschnitten: dem *Caecum*, gefolgt von dem *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens*, *Colon sigmoideum* und schließlich dem *Rektum*. Physiologisch dient das Kolon der Bewegung des Darminhalts in Richtung *Rektum* und *Anus*, der Absorption von Flüssigkeiten und Elektrolyten, der Absorption von kurzkettigen Fettsäuren und der Darmentleerung (Carrington und Scott 2014).

Laut *National Cancer Institute* liegt das Durchschnittsalter für kolorektale Karzinome bei Diagnose bei 67 Jahren (National Cancer Institute 2022). Solche malignen Transformationen entwickeln sich über

Jahre aus zunächst kleinen Hyperproliferationen und Polypen (Simon 2016). Die Entwicklung von einem Polypen zu einem noch gutartigen Tumor, einem sogenannten Adenom, dauert alleine ca. 5-20 Jahre. Damit sich aus einem Adenom ein bösartiger Tumor entwickelt, der metastasiert und in umliegendes Gewebe invadiert, dauert es weitere 5-15 Jahre. Verschiedene Mutationen, die Aktivierungen und Inaktivierungen von Proteinen und Transkriptionsfaktoren zur Folge haben, sind für die Progression verantwortlich (s. Abb. 2) (Weinberg 2014).



Abbildung 2: Progression eines Kolonkarzinoms. Nach: "The Biology of Cancer" von Robert A. Weinberg, 2. Edition, Kapitel 11: Multi-Step Tumorigenesis

Dabei stellt zunächst der Verlust bzw. die Mutation von *APC* einen essentiellen primären Schritt in der Progression eines Kolonkarzinoms dar. Durch den Verlust bzw. die Mutation von *APC* kommt es zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Darauffolgend wird dieses in den Zellkern transloziert, wo es nachgeschaltete Wnt-Effektoren hoch reguliert und damit Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung der Zellen fördert. Eine solche Mutation ist in ca. 90% der CRC Patienten zu finden.

Auch *Kras*-Mutationen sind in 35-40% der Patienten auffindbar. Dabei kommt es, wie oben bereits beschrieben, zu einer dauerhaften Aktivierung des Proto-Onkogens Ras durch Resistenzentwicklung gegenüber GTP-Hydrolyse, was letztlich zu gesteigerter Proliferation der Zellen führt (Nguyen und Duong 2018). Wie einige Publikationen zeigen konnten, korrelieren *Kras*-Mutationen mit einem schlechterem Überleben und einer schlechteren Prognose (Conlin et al. 2005; Phipps et al. 2013). Außerdem zeigen CRC-Zellen mit *Kras*-Mutationen eine erhöhte Resistenz gegenüber EGFR-Reagentien (Amado et al. 2008; Lièvre et al. 2008).

Bei der Entwicklung eines Adenoms wird auch der Verlust des Chromosoms 18q beobachtet, was in ca. 70% der Fälle der späten Adenome der Fall ist. Dieser Verlust geht ebenso mit einer schlechteren Prognose einher (Jen et al. 1994). Mit dem Verlust von 18q gehen auch einige Tumorsuppressoren verloren, darunter SMAD2 und SMAD4. Dabei entwickeln die Zellen eine Resistenz gegenüber TGFβ, was physiologisch antiproliferativ und proapoptotisch wirkt und durch die Resistenz die Tumorgenese fördert.

Auch der Verlust des Tumorsuppressors p53, der sonst für die DNA-Reparatur, Induktion eines Zellzyklussarrests, Seneszenz und Apoptose verantwortlich ist, stellt einen wichtigen finalen Schritt in der Entwicklung eines Karzinoms dar (Nguyen und Duong 2018). p53-defiziente oder -mutierte Zellen sind in 50-75% der CRC Patienten vorhanden. In Karzinomen sind jedoch häufiger p53-defiziente Zellen zu finden als in Adenomen, was vermuten lässt, dass dieser Verlust eine essentielle Rolle beim Übergang eines Adenoms zu einem Karzinom spielt (Fearon und Vogelstein 1990; Takayama et al. 2006). Den Hauptanteil der *p53*-Mutationen in CRC stellen Misssense-Mutationen dar (Nguyen und Duong 2018).

Besonders gefährdet für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms sind Menschen, die sich nur wenig körperlich betätigen, viel Salz und rotes Fleisch verzehren (Lewandowska et al. 2022). Auch aktives und passives Rauchen, Übergewicht und die familiäre Prädisposition stellen Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms dar (Lewandowska et al. 2022; Johnson et al. 2013; Sawicki et al. 2021). Auch entzündliche Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts wie beispielswiese Morbus-Crohn oder auch Colitis ulcerosa unterstützen durch eine unkontrollierte Inflammation und die daraus resultierende Schwächung des Immunsystems des gastrointestinal (GI)Trakts die Entwicklung und Progression eines Kolonkarzinoms. Dabei entwickeln Patienten mit einer chronisch inflammatorischen Erkrankung des Magen-Darm-Trakts zwei bis sechs Mal häufiger ein Kolonkarzinom (Sawicki et al. 2021). Laut CDC äußern sich Tumore und Polypen des GI-Trakts hauptsächlich durch rektale Blutungen, abdominale Schmerzen, Gewichtsverlust, Anämie, abdominale Gewebebildung und Diarrhoe (Sawicki et al. 2021; Centers for Disease Control and Prevention 2022c, 2022b).

Diagnostiziert werden kolorektale Karzinome hauptsächlich durch eine Koloskopie, die entweder nach Verdacht durch Symptomauftreten oder im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung stattfindet. Sollte während der Darmspiegelung neoplastisches Gewebe oder Polypen entdeckt werden, werden diese direkt entfernt und histologisch untersucht. Neben der Koloskopie des gesamten Darms können auch nur bestimmte Bereiche untersucht werden, beispielsweise durch eine Endoskopie, Rektoskopie oder Sigmoidoskopie. Auch Tastuntersuchungen und bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Ultraschall oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind sinnvolle diagnostische Mittel zur Erkennung von Tumoren und Neoplasien. Auch ein Hämocculttest des Bluts kann Aufschluss geben (Di Xia et al. 2016; Vega et al. 2015; Deutsche Krebsgesellschaft).

1.2. <u>VCP</u>

Das Valosin containing Protein (VCP), auch p97 genannt, gehört zur Familie der AAA+ ATPasen und wurde 1982 erstmal als Cdc48 in Saccharomyces cerevisiae beschrieben (Costantini et al. 2021; Moir et al. 1982). Das Chaperon ist 806 Aminosäuren und 97 kDa groß und besteht aus vier Domänen: einer N-terminalen, zwei ATPase Domänen und einer C-terminalen Domänen. Dabei fungieren die N- und C-terminalen Domäne als Interaktionsstelle für Substrate, Interaktionspartner und Kofaktoren. Die ATPase Domänen sind für die Hydrolyse von ATP verantwortlich (Yeo und Yu 2016; Costantini et al. 2021; DeLaBarre und Brunger 2003). VCP spielt eine Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen der Proteindegradation via *Unfolded Protein System* (UPS), Apoptose und der Reifung und Initiierung der Autophagosomen (Di Xia et al. 2016). Mutationen in VCP sind auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie Amyotropher Lateralsklerose (ALS) oder der Huntington Erkrankung beschrieben (Guo et al. 2016; Johnson et al. 2010).

Ein Prozess bei dem VCP eine wichtige Rolle spielt, ist die Endoplasmatisches Retikulum (ER)assoziierte Degradation (ERAD) fehlgefalteter oder ungefalteter Proteine (Meyer et al. 2012). Dabei rekrutiert das integrale Membranprotein Ubx2 an der zytosolischen Seite des ERs den VCP-Ufd1 (Ubiquitin Fusion Degradation Protein1)- Npl4 (Nuclear Pore Localization Protein4) Komplex. Dieser Komplex bindet ubiquitinierte Proteine, wodurch diese ins Zytosol translokalisiert werden. Diese sogenannte Retrotranslokalisation führt dann letztendlich zur proteasomalen Degradation der Proteine (Costantini et al. 2021).

Analog zur ERAD ist VCP auch bei der Mitochondrien-assoziierten Degradation von Substraten notwendig (Meyer et al. 2012). Dabei kommt es zunächst zur Translokalisation von Vms1 (VCP-associated mitochondrial stress-responsive 1) aus dem Zytosol ins Mitochondrium. Ein Komplex bestehend aus VCP und Npl4 interagiert dann mit Vms1 an der äußeren Mitochondrienmembran, was zur Extraktion ubiquitinierter Substrate und deren Transport zum Proteasom führt.

Neben den Proteasom-abhängigen Prozessen kann VCP auch Proteasom-unabhängig zur Protein Degradation beitragen. Dabei sind die Komplexe aus VCP und p47 oder auch UBXD1 (Ubiquitin Regulatory X Domain-Containing Protein1) mit der Membranfusion und dem Transport zu Endosomen assoziiert, was zur lysosomalen Degradation führt. Dieser Prozess beschreibt die Segregasefunktion von VCP. VCP-UBXD1 wird zu monoubiquitinierten Substratoligomeren an der Endosomenmembran rekrutiert. Der Komplex separiert diese Oligomere und verpackt sie in intraluminale Vesikel, die dann lysosomal degradiert werden (Costantini et al. 2021).

Auch bei DNA-Schäden und Doppelstrangbrüchen (DSB) sind VCP und seine Segregasefunktion involviert. Nach einem DSB kommt es zunächst durch die Ubiquitinligase RNF8 zur Polyubiquitinierung an Lysin 48. VCP wird dann durch den heterodimeren Adaptor UFD1-Npl4 zum polyubiquitiniertem Lysin 48 rekrutiert. Dort entfernt es unter ATP-Hydrolyse die Ubiquitinketten,

wodurch Signalkomplexe die Anordnung verschiedener *downstream* Faktoren wie 53BP1, Brca1 oder Rad51 veranlassen, was letztlich für die DNA-Reparatur und Genomstabilität einen wichtigen Schritt darstellt (Meerang et al. 2011).

Neben den eben genannten Funktionen weist VCP noch weitere zelluläre Funktionen auf. Constantini et. al hat 2021 diese Funktionen in einer Publikation eruiert und in folgender Abbildung zusammengefasst (Costantini et al. 2021).



Abbildung 3: Vielfältige Funktionen von VCP im zellulären Kontext (reproduziert aus Costantini et al. 2021)

Alle beschriebenen Funktionen von VCP entsprechen den physiologischen Funktionen in untransformierten Zellen. Daher richtet sich das Augenmerk dieser Arbeit auf transformierte Zellen und die Veränderung der Funktionen von VCP in eben diesen Zellen, speziell in kolorektalen Tumorzellen.

In einige Tumorentitäten wurde bereits eine Überexpression von VCP beschrieben, die letztlich zu einer schlechteren Überlebensrate, vermehrter Metastasierung und häufigerem Lymphknotenbefall führt. Beispielsweise korreliert eine vermehrte VCP-Expression in hepatozellulären Karzinomen mit dem Gesamt- und rückfallfreiem Überleben von Patienten (Yamamoto et al. 2003b). Auch in Magenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die VCP-Überexpression mit größeren Tumoren, vermehrter vaskulärer und lymphatischer Invasion, Lymphknotenmetastasierung und einer geringeren Überlebensrate einhergeht (Yamamoto et al. 2003a). Eine Infektion von Magen-Adenokarzinomzellen

mit *Heliobacter pylori* führte ebenfalls zu erhöhten VCP-Leveln, was die Interaktion von VCP mit dem Proto-Onkogen Akt verstärkt und über eine Phosphorylierung von VCP das Überleben epithelialer Zellen und die Degradation verschiedener zellulärer Regulatoren erhöht (Chan et al. 2006). Sehr ähnlich sieht es bei Ösophaguskarzinomen aus. Auch hier korrelieren die erhöhten VCP-Level mit häufigerem Lymphknotenbefall, Metastasierung, tieferer Invasion und vermehrtem Wiederauftreten der Erkrankung (Yamamoto et al. 2004a).

Wie eine TCGA und GTEx Datenbankanalyse zeigt, korrelieren geringere VCP-Expressionslevel in kolorektalem Tumorgewebe nicht mit einem längeren krankheitsfreien oder Gesamtüberleben der Patienten (Abb. 4). Eine Publikation aus dem Jahr 2004 beschrieb allerdings erhöhte VCP-Expression in kolorektalen Adenokarzinomen, die einer erhöhten Invasionstiefe der Tumore, vermehrter vaskulären Invasion, einem höheren Risiko für ein Wiederauftreten der Erkrankung und einer schlechteren 5 Jahres Überlebensrate assoziiert waren (Yamamoto et al. 2004b).



Abbildung 4: Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben in Relation zu VCP-Expressionslevel. Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens (links) bzw. des Krankheitsfreien Überlebens (rechts) von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, unterteilt in hohe (rot) und niedrige (blau) VCP Expressionslevel. HR= Hazard ratio, n= Anzahl Proben (Tang et al. 2019)

Die Ergebnisse dieser Studie und der Datenbankanalyse stehen im Kontrast zueinander, was eine eindeutige Aussage über VCP als Prognosemarker im kolorektalen Karzinom nicht zulässt. Allerdings zeigen unter anderem die oben genannten Publikationen und die bisher kaum vorhandenen Untersuchungen der Funktionen von VCP im Kolonkarzinom, dass VCP trotz allem eine interessante und wichtige Zielstruktur für weitere Analysen, speziell im Kolonkarzinom, darstellt.

1.3. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Um spezielle zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zu identifizieren, wurde in der Arbeitsgruppe Buchholz (Gastroenterologie, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Marburg) in vorangegangenen Arbeiten ein sogenanntes shRNA Library Screening durchgeführt. Diese shRNA Bibliothek der Firma Cellecta besteht aus verschiedenen shRNA für verschiedene Gene, um so spezifische Effekte und Expressionsänderungen und -hemmungen für verschiedene Gene zu analysieren und off-target Effekte minimieren zu können (Schimanski 2021). Für diese Analyse wurden Zellen der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie BxPC3 lentiviral mit der shRNA Bibliothek transduziert. Da diese Bibliothek eine Puromycin-Resistenz enthält, konnten anschließend mittels Puromycin-Selektion die erfolgreich transduzierten Zellen isoliert werden. Anschließend wurden die Puromycin-resistenten Zellen mittels Hochdurchsatzsequenzierung erneut auf eine erfolgreiche Transduktion mit shRNAs analysiert. Dieser Schritt wurde nach einer neuntägigen Kultivierung wiederholt und die Differenzen im Vergleich zur ersten Sequenzierung untersucht, um für die Viabilität der Zellen essentielle Gene und somit potentielle Zielgene zu identifizieren. Als Zielgen wurden Gene definiert, wenn die Viabilität der Zellen durch mindestens drei unabhängige shRNAs signifikant inhibiert wurde und ein Inhibitor für das kodierte Protein verfügbar ist. Eines dieser potentiellen Zielgene war VCP. Dieses Screening erfolgte in Zusammenarbeit mit AG Hoheisel (Functional Genome Analysis, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).

Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit wurde der Effekt einer *VCP*-Inhibition auf die Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPC3, SUIT2-007 und PaTu-8988t untersucht. Dabei konnte mittels siRNA-vermittelten Knockdowns zunächst eine Herunterregulierung der, sonst in Pankreaskarzinomund Pankreatitiszellen erhöhten, *VCP*-Level auf RNA-Ebene beobachtet werden. In Folge konnte eine Reduktion der Zellviabilität via MTT-Assay und der Proliferation via BrdU-Assay festgestellt werden. Apoptose als Ursache dieser Inhibition konnte via Western Blot nicht bestätigt werden. Auch die Proteinlevel der Zellzyklusregulatoren p21 und Cyclin D1 wurden durch den *VCP*-Knockdown beeinflusst. Dabei wurde im Western Blot eine Erhöhung von p21 und eine Reduktion Cyclin D1 beobachtet.

1.4. Zielsetzung

Wie eine Datenbankanalyse zeigte, weist Tumorgewebe aus Kolonkarzinomen eine erhöhte VCP-Expression verglichen mit Normalgewebe auf (Abb. 5). Was diese Überexpression allerdings funktionell zur Folge hat, ist nicht beschrieben. Eine Untersuchung der funktionellen Folgen und damit verbunden ein Knockdown von VCP stellt daher einen interessanten Ausgangspunkt für die Untersuchung und Charakterisierung der Rolle von VCP in Kolonkarzinomzellen dar. Dabei sollen die Effekte des VCP-Knockdowns auf Proliferation, Viabilität, Zellzyklusregulation und weitere zelluläre Prozesse genauer untersucht werden, um so Aussagen über die Expression von VCP als prognostischer Marker oder auch therapeutisches Ziel treffen zu können.



Abbildung 5: VCP-Expression in Kolon Adenokarzinomen (rot) verglichen mit gesundem Gewebe (grau).COAD = Colonadenocarcinoma, T = Tumorgewebe, N=Normalgewebe, num= Anzahl getesteter Gewebeproben. Box Plot Expressions Analyse via GEPIA2, Expression DIY Analyse Tool (Tang et al. 2019)

Wie bereits in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden konnte, hatte der Knockdown von VCP durchaus einen antiproliferativen und viabilitätsreduzierenden Effekt. Dieses Versuchsmodell soll in dieser Arbeit auf Kolonkarzinomzellen übertragen und erweitert werden. Es sollen neben Viabilität und Apoptose auch weitere, tiefgehendere Analysen durchgeführt werden und dabei die Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und diverse weitere zelluläre Mechanismen genauer untersucht werden, um so letztlich Aussagen über die Funktion von VCP und über VCP als potentielle Zielstruktur und Prognosemarker speziell in Kolonkarzinomen treffen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1.Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR Systems	Applied Biosystems (Foster
	City, USA)
Autoclav VW 150	Systec GmbH (Linden, D)
DX 65	
DV 65	
Axio Cam MRm Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Sports Optics GmbH
	(Wetzlar, D)
BD FACS Canto II	Becton Dickinson (Franklin
	Lakes, USA)
Beckman Coulter CytoFLEX LX6	Beckman Coulter (Kalifornien,
	USA)
Chemocam Imager	Intas Science Imaging
	Instruments GmbH (Göttingen,
	D)
Easyphor Gelelektrophorese Kammer	Biozym Scientific GmbH
	(Hessisch Oldendorf, D)
EC250-90 Electrophoresis Power Supply	EC Apparatus Corporation
	(Maynard, USA)
Eismaschine AF80	Scotsman Ice Systems (Mailand,
	IT)
Feinwaage S403	Denver Instrument GmbH (
	Göttingen, D)
Gefrierschrank Premium	Liebherr (Bulle, D)
Geldokumentation	Intas Science Imaging
	Instruments GmbH (Göttingen,
	D)
HERAcell 240iCo ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)

Herafreeze HFU T series (-80°C)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Kippschüttler RS-RS-5	Phönix Instrument (Garbsen, D)
Kühlschrank Premium	Liebherr (Bulle, D)
Megafuge 1.0R Heraeus	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Megafuge 8 Heraeus	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Mikro200R Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG
	(Tuttlingen, D)
Mikroskop	Olympus Corporation (Tokyo,
	JPN)
Mini Protean Tetra System Blottingkammern	BioRad Laboratories GmbH
	(München, D)
Minizentrifuge Z100M	Hermle Labortechnik GmbH
	(Wehingen, D)
MSC Advantage Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Multiskan FC Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Multistep Pipette	
Nanodrop 1000	Peqlab Biotechnologies GmbH
	(Erlangen, D)
omniPage Mini Vertical Protein Electrophoresis	Cleaver Scientific Ltd. (Rugby,
System	UK)
PeqPower 300V Power Supply	Peqlab Biotechnologies GmbH
	(Erlangen, D)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences Deutschland
	GmbH (Biebertal, D)
Pipet-Lite Mehrkanal L8-10XL (20 – 300µl, 0,5	Mettler-Toledo GmbH
- 10µl)	(Gießne,D)
Pipetten Discovery Comfort (0,5 - 10µl; 10 -	HTL Lab Solutions (Warschau,
100μ l, $20 - 200\mu$ l, $200 - 1000\mu$ l)	P)
PowerPac HC High-Current Power Supply	BioRad Laboratories GmbH
	(München, D)

PS 500XT DC Power Supply	Hoefer Scientific Instruments
	(Holliston, USA)
Reagenzglasschüttler REAX	Heidolph (Schwabach, D)
See-saw Rocker SSL4	Stuart Equipment (Stafforshire, UK)
T100 Thermal Cycler	BioRad Laboratories GmbH (München, D)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, D)

Tabelle 1: Liste verwendeter Laborgeräte

2.1.2.Material

Material	Hersteller
15ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
	D)
50ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio One GmbH
	(Gremsmünster, AU)
5ml Röhren	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
	D)
6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio One GmbH
	(Gremsmünster, AU)
24 Well Culture Plate	Greiner Bio One GmbH
	(Gremsmünster, AU)
96 Well Cell Culture Plate	Greine Bio One GmbH
	(Gremsmünster, AU)
Amersham Protran Nitrocellulose Membran;	GE Healthcare (Freiburg, D)
0.2µm	
Bechergläser	Duran Group GmbH
	(Wertheim/Main, D)
Blotting Paper	Macherey-Nagel (Düren, D)
Combitips advanced	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Deckgläser Coverslips 24mm x 24mm	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Einmal Handschuhe	Semperit AG (Wien, AT)
Gewindeflaschen	Duran Group GmbH
	(Wertheim/Main, D)
- 12 -	I

Low Binding Micro Tubes Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Menzel Gläser SuperFrost Plus Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml Applied Biosystems (Foster City, USA) Mikrotestplatte 96-Well Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Multiply μ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µ1 D) - 200µ1 D - 1000µ1 Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Hamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	Immobilon®-P PVDF Membrane	Merck KGaA (Darmstadt, D)
D) Menzel Gläser SuperFrost Plus Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml Applied Biosystems (Foster City, USA) Mikrotestplatte 96-Well Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Multiply µ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µl D) - 200µl Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Hamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) - 10ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) 725 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	Low Binding Micro Tubes	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
Menzel Gläser SuperFrost Plus Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml Applied Biosystems (Foster City, USA) Mikrotestplatte 96-Well Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Multiply µ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µl D) - 200µl Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Hamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) - 10ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) - 5ml D) - 50ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		D)
(Waltham, USA)MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1mlApplied Biosystems (Foster City, USA)Mikrotestplatte 96-WellSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Multiply µ Strip 4er KetteSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Multiply µ Strip 4er KetteSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)PipettenspitzenPlan Optik AG (Elsoff, D)PipettenspitzenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 10µlD)- 200µlD)- 1000µlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Reagent RerservoirsEppendorf AG (Hamburg, D)Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 5mlD)- 10ml- 25ml- 50mlT25 ZellkulturflaschenT75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	Menzel Gläser SuperFrost Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.
MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml Applied Biosystems (Foster City, USA) Mikrotestplatte 96-Well Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Multiply μ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µ1 D) - 200µ1 D) - 1000µ1 Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		(Waltham, USA)
City, USA)Mikrotestplatte 96-WellSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Multiply µ Strip 4er KetteSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Neubauer ZählkammerPlan Optik AG (Elsoff, D)PipettenspitzenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 10µlD)- 200µlD)- 1000µlEppendorf AG (Hamburg, D)Reagent RerservoirsEppendorf AG (Hamburg, D)Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 2mlD)- 5mlD)- 5mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml	Applied Biosystems (Foster
Mikrotestplatte 96-Well Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Multiply µ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µl D) - 200µl D) - 1000µl Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Kamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		City, USA)
D)Multiply μ Strip 4er KetteSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Neubauer ZählkammerPlan Optik AG (Elsoff, D)PipettenspitzenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 10μ1D)- 200μ1D)- 1000μ1Eppendorf AG (Hamburg, D)Reagent RerservoirsEppendorf AG (Hamburg, D)Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 2mlD)- 5mlD)- 10ml25ml- 50mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	Mikrotestplatte 96-Well	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
Multiply μ Strip 4er Kette Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 10µl D) - 200µl D) - 1000µl Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 50ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		D)
D)Neubauer ZählkammerPlan Optik AG (Elsoff, D)PipettenspitzenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,- 10µlD)- 200µlD)- 1000µlEppendorf AG (Hamburg, D)Reagent RerservoirsEppendorf AG & Co. (Nümbrecht, D)Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 2mlD)- 5mlD)- 10mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 50mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	Multiply µ Strip 4er Kette	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
Neubauer Zählkammer Plan Optik AG (Elsoff, D) Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, - 10µl D) - 200µl D) - 1000µl Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Kamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 10ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		D)
Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, - 10μ1 D) - 200μ1 D) - 1000μ1 Eppendorf AG (Hamburg, D) Reagent Rerservoirs Eppendorf AG & Co. (Nümbrecht, D) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, - 2ml D) - 5ml D) - 10ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, - 25ml D) - 50ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	Neubauer Zählkammer	Plan Optik AG (Elsoff, D)
- 10μ1 D) - 200μ1	Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
- 200μl - 1000μl Reagent Reservoirs Eppendorf AG (Hamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) - 50ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	- 10µ1	D)
- 1000μl Reagent Rerservoirs Eppendorf AG (Hamburg, D) Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml) Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) Serologische Pipetten Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 2ml D) - 5ml D) - 5ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) - 5ml D) - 5ml D) - 50ml Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	- 200µ1	
Reagent RerservoirsEppendorf AG (Hamburg, D)Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 2mlD)- 5mlD)- 10ml25ml- 50mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	- 1000µ1	
Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)- 2mlD)- 5mlD)- 10ml 25ml 50mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	Reagent Rerservoirs	Eppendorf AG (Hamburg, D)
D)Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,- 2mlD)- 5mlD)- 10ml 25ml 50mlSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,D)D)T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,D)D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
Serologische PipettenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht,- 2mlD)- 5mlD)- 10ml- 25ml- 50ml- 50mlT25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)		D)
 2ml 5ml 10ml 25ml 50ml 50ml T25 Zellkulturflaschen T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA) 	Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
- 5ml - 10ml - 25ml - 50ml T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	- 2ml	D)
 10ml 25ml 50ml T25 Zellkulturflaschen T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom 	- 5ml	
- 25ml - 50ml T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	- 10ml	
- 50ml T25 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	- 25ml	
T25 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	- 50ml	
D)T75 ZellkulturflaschenSarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)ViewPlate-96 Black, optically clear bottomPerkin Elmer (Waltham, USA)	T25 Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
T75 Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		D)
D) ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)	T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht,
ViewPlate-96 Black, optically clear bottom Perkin Elmer (Waltham, USA)		D)
·	ViewPlate-96 Black, optically clear bottom	Perkin Elmer (Waltham, USA)

Tabelle 2: Liste verwendeter Materialien

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
2-Propanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
5x Colourless GoTaq Flexi Buffer	Promega GmbH (Walldorf, D)
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Agarose Standard	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ammonium Persulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH
	(Heidelberg, D)
Ampicilline sodium salt	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Annexin V Binding Buffer	BioLegend (San Diego, USA)
Aqua dest.	B.Braun (Melsungen, D)
Bafilomycin A1	MedChemExpress (New Jersey,
	USA)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
C ₁₂ FDG	Cayman Chemical (Michigan, USA)
CB5083	MedChemExpress (New Jersey,
	USA)
Clarity Max Western ECL Sustrate	BioRad (Kalifornien, USA)
Clarity Western ECL Substrate	BioRad (Kalifornien, USA)
CoomassiePlus TM Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
dNTP Mix 10mM	Biozym Scientific GmbH (Hessisch
	Oldendorf, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Ethanol absolut, vergällt mit MEK	Otto Fischar GmbH & Co KG
	(Saarbrücken, USA)
Ethylene Glycol-bis(2-aminoethylether)-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N,N,N ⁴ ,N ⁴ -tetraacetic Acid (EGTA)	
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetale Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific
	(Ebsdorfergrund, D)
- 14 -	

FITC Annexin V	BioLegend (San Diego, USA)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
GoTaq® G2 DNA Polymerase	Promega GmbH (Walldorf, D)
HDGreen Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments
	GmbH (Göttingen, D)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	BioRad (Kalifornien, USA)
Lipofectamine® RNAiMax Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Luria Broth (LB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
NaF	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natriumpyrophosphat (Na4P2O7)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
NMS873	MedChemExpress (New Jersey,
	USA)
Nocodazole	Biomol GmbH (Hamburg, D)
Ortho V (Sod. O. Vanadate) Na ₃ VO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Penicillin Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Polyethylenimine, Linear, MW 25.000 (PEI)	Polysciences, Inc. (Warrington,
	USA)
Propidium Iodide Solution (PI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ProteaseArrest TM	GBiosciences (St. Louis, USA)
Puresept AF	Schülke & Meyer GmbH
	(Norderstedt, D)
Puromycin Solution 10mg/ml	InvivoGen (San Diego, USA)

RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Roti®mount Fluor Care DAPI	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(Waltham, USA)
Salzsäure rauchend 37%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
SDS Ultra pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Thiazolyl Blau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
TRIS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Triton-X100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trypsin-EDTA (0,5%) in DPBS (10x)	Capricorn Scientific
	(Ebsdorfergrund, D)
Tween-20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Western Lightning Ultra	Perkin Elmer (Waltham, USA)

Tabelle 3: Liste verwendeter Chemikalien und Reagenzien

2.1.4.<u>siRNAs</u>

Alle siRNAs wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) hergestellt und auf eine Konzentration von $20\mu M$ mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Aliquots wurden bei -20° C gelagert.

siRNA	Cat. No.	Sequenz	Hersteller
Negative Control	1027310	5' -aatteteegaacgtgteacgt-	Qiagen (Hilden,
siRNA		3'	D)
(20 nmol)			
siVCP1	119275	5'-	Applied
		cgagaagcuguuugcaucgtt-3'	Biosystems
			(Carlsbad, USA)
siVCP2	119277	5'-	Applied
		gcgauuuucauuugguaggtt-	Biosystems
		3'	(Carlsbad, USA)
siVCP3	191743	5'-	Applied
		ggaaagaagagacgagaagtt-3'	Biosystems
			(Carlsbad, USA)

Tabelle 4: Liste verwendeter siRNAs

2.1.5.<u>Primer</u>

Alle Primer wurden von der Firma Biomers.net (Ulm, D) hergestellt. Die gelieferten Primer wurden bei -20° C gelagert und vor Benutzung von der Ausgangskonzentration auf 10μ M mit Aqua dest. verdünnt und bei 4°C gelagert.

Primer	Sequenz
ATF4	
for	5'-gcccgcccacagatgtagt-3'
rev	5'-aggcactgctgcccctaata-3'
ATF6	
for	5'-ggagtcacacagctccctaatca-3'
rev	5'-gtaggacaggtttagtcacggaaag-3'
Cyclin D1	
for	5'-cagaacacggctcacgctta-3'
rev	5'-cttgccccatcacgacaga-3'
E2F1	
for	5' -ccctctcctctgtctccagaag- 3'
rev	5° -cacatacacaccacacagactcett- 3
E2F2	
for	5' -cgcatgtgaagtgaaaaccttct- 3'
rev	5' -ggcgtgtggccaccat- 3'
E2F3	
for	5' -tttgacttagtatccggcacaca- 3'
rev	5' -aatagcagcaactcaatggtacca- 3'
E2F4	
for	5° -cggacccaaccettetacet- 3°
rev	5° -tcgtgtgggatcaaagatttctg- 3°
E2F5	
for	5' -agcccgtggtttttcctgtt- 3'
rev	5° -tgagttgccatgctggatttc- 3°
E2F6	
for	5' -gaaggcagtgtcccaaaaacc- 3'
rev	5° -aggagaacatttgccacattca- 3
E2F7	
for	
	•

rev	5' -acaacctgagtcccccgttt- 3'
	5' -atgtgtgcgttggatgctctt- 3'
E2F8	
for	5 [°] -ccaaccetgetgtaataatga- 3 [°]
rev	5° -ctctctaggacgttcacgatatcg- 3°
OligoDt	5° -ttttttttttt-3°
p15	
for	5'-cgtgggaaagaagggaagagt-3'
rev	5'-cttgttctcctcgcgcattc-3'
p16	
for	5'-ctgtcgacttcacaagcatt-3'
rev	5'-gagctttggttctgccatttg-3'
p18	
for	5'-ctgtgatttggccaggctcta-3'
rev	5'-ccctccccagctttattgaa-3'
p19	
for	5'-gctgatgtcaacgtgcctgat-3'
rev	5'-cagattcagctgccagaaagc-3'
p21	
for	5'-tgattagcagcggaacaagga-3'
rev	5'-aactacteccagececatatga-3'
p27	
for	5'-tgccctccccagtctctctta-3'
rev	5'-caagcacctcggatttttgc-3'
XS-13	
for	5' -tgggcaagaacaccatgatg- 3'
rev	5' -agtttctccagagctgggttgt- 3'

Tabelle 5: Liste verwendeter Primer

2.1.6.Kits

	Kit			Hersteller
Cell	Proliferation	ELISA,	BrdU	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim,
(chemi	luminescent)			D)
Qiager	n Plasmid Midi Ki	t (25)		Qiagen (Hilden, D)
QiaAm	np DNA Mini Kit	(50)		Qiagen (Hilden, D)

Omniscript RT Kit (200)	Qiagen	(Hilden, D)	
PeqGold Total RNA Kit	VWR USA)	International	(Pennsylvania,

Tabelle 6: Liste verwendeter Kits

2.1.7. Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
anti-(cleaved)-PARP	Hase,	Cell Signaling	1: 1000
	polyklonal	(Davers, USA)	
anti-ATF4	Ratte,	Biolegend (San	1: 500
	monoklonal	Diego, USA)	
anti-ATF6	Ratte,	Biolegend (San	1: 1000
	monoklonal	Diego, USA)	
anti-Cyclin A	Hase,	Santa Cruz	1: 1000
	polyklonal	Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	
anti-Cyclin B1	Maus,	Cell Signaling	1: 1000
	monoklonal	(Davers, USA)	
anti-Cyclin D1	Hase,	Abcam	1: 500
	monoklonal	(Cambridge,	
		USA)	
anti-Cyclin E	Hase,	Santa Cruz	1: 1000
	polyklonal	Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	
anti-LC3	Hase,	Cell Signaling	1: 1000
	polyklonal	(Davers, USA)	
anti-mouse IgG, HRP-	Pferd	Cell Signaling	1: 10 000
konjugiert		(Davers, USA)	
anti-p15	Hase,	Santa Cruz	1: 1000
	polyklonal	Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	

anti-p21	Hase,	Cell Signaling	1:1000
	monoklonal	(Davers, USA)	
anti-p27	Hase,	Santa Cruz	1:1000
	polyklonal	Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	
anti-p62	Hase,	Sigma-Aldrich	1:2000
	polyklonal	GmbH (St.	
		Louis, USA)	
anti-Polyubiquitin	Maus,	Enzo Life	1: 1000
	monoklonal	Sciences GmbH	
		(Lörrach, D)	
anti-rabbit IgG, HRP-	Ziege	Santa Cruz	1: 10 000
konjugiert		Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	
anti-rabbit IgG, Alexa	Ziege	Thermo Fisher	1:500
Fluor488-konjugiert		Scientific Inc.	
		(Waltham,	
		USA)	
anti-rat IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Santa Cruz	1:10 000
		Biotechnologies	
		Inc. (Dallas,	
		USA)	
anti-ß-Aktin	Maus,	Sigma-Aldrich	1:40 000
	monoklonal	GmbH (St.	
		Louis, USA)	
anti-XBP-1s	Maus,	Biolegend (San	1: 500
	monoklonal	Diego, USA)	
anti-yH2AX	Hase,	Cell Signaling	1:200
	monoklonal	(Davers, USA)	

Tabelle 7: Liste verwendeter Antikörper

2.1.8. Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	pH-Wert
10% APS	1g Ammonium Persulfat	
	+ 10ml Aqua dest.	
10% Trenngel	2,5ml Trenngelpuffer	
	+ 4,2 ml Aqua dest	
	+ 3,3 Acrylamid	
	+ 25µl APS	
	+ 25µl TEMED	
10x Blottingpuffer	30,3 g Tris Base (250 nM Tris Base)	
	+ 144,1 g Glycin (1,92 M Glycin)	
	auf 1L mit Aqua dest auffüllen	
10x Ladepuffer blau	3g Glycerol	
	+ 0,025g Bromphenolblau	
	auf 10ml mit Aqua dest. auffüllen	
10x Laufpuffer	0,3 g Tris (250 nM Tris Base)	
	+ 144 g Glycin (1,92 M Glycin)	
	+ 10 g SDS (1% SDS)	
	auf 1L mit Aqua dest auffüllen	
10x TBS	42,2 g Tris Base	7,6
	+ 80 g NaCl	
	+ 15 mL HCl (37%)	
	auf 1L mit Aqua dest auffüllen	
15% Trenngel	2,5 ml Trenngelpuffer	
	+ 2,5ml Aqua dest.	
	+ 5ml Acrylamid	
	+ 25µl APS	
	+ 25µl TEMED	
1x Blottingpuffer	100ml 10x Blottingpuffer	
	+ 200ml Methanol	
	+ 600ml Aqua dest.	
1x Laufpuffer	100ml 10x Laufpuffer	
	+ 900ml Aqua dest.	
	I	l i i i i i i i i i i i i i i i i i i i

1x Lysepuffer	12,5 ml 1M HEPES (pH=7,5)	
	+ 7,5ml 5M NaCl	
	+ 1,25ml 200mM EGTA (pH=8,0)	
	+ 25ml 100% Gylerin	
	+ 2,5ml Triton-X100	
	+ 1,05g NaF	
	+ 1,115g Na ₄ P ₂ O ₇	
	auf 250ml mit Aqua dest. Auffüllen	
	vor Benutzung:	
	960 µL 1x Lysepuffer	
	+ 20 μL Na3VO4	
	+ 10 μL PMFS	
	+ 10µL 100x Protease Arrest	
1x TAE-Puffer	100ml 10x TAE	
	+ 900ml Aqua dest	
4x SDS-Ladepuffer	2 g Tris HCL (235 nM)	6,8
	+ 25 g Bromphenolblau	
	+ 25 mL dest. Wasser	
	+ Glycerol	
	+ 5 mL 20% SDS (2% SDS)	
	auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen	
5% Magermilchlösung	2g Milchpulver	
	+ 40ml TBST	
Ampicillin [50mg/ml]	50mg Ampicillin sodium salt	
	+ 1ml Aqaua dest	
BSA [1µg/µl]	1mg BSA	
	+ 1ml Aqua dest.	
BSA 5%	2g BSA	
	+ 40ml TBST	
DTT [1M]	154,25 mg DTT	
	+ 1ml Aqua dest.	
Ethanol 70%	35ml Ethanol absolut	
	+ 15ml Aqua dest.	
Ethanol 80%	40ml Ethanol absolut	

LB-Agar	4g Luria Broth with Agar (Miller)	
	+ 100ml Aqua dest.	
LB-Medium	25g Luria Broth	
	+ 1L Aqua dest.	
MTT-Reagenz	5mg Thiazolylblau	
	+ 1ml PBS	
MTT-Solubilisierungslösung	8ml 2-Propanol	
	+ 1ml Triton-X100	
	+ 1ml 1M HCl	
Sammelgel	5ml Ready-to-use	
	Sammelgellösung	
	+ 15µl APS	
	+ 15µl TEMED	
Sammelgellösung ready-to-use	25ml Sammelgelpuffer	
	+ 59ml Aqua dest.	
	+ 16ml Acrylamid	
Sammelgelpuffer	6,06g Tris (0,5M Tris/Base)	6,8
	+ 2ml 20% SDS (0,4% SDS)	
	auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen	
TBST	100ml 10x TBS	
	+ 900ml Aqua dest	
	+ 1ml Tween-20	
TE-Puffer	10mM Tris Hydrochlorid	8,0
	+ 1ml EDTA	
	auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen	
Trenngelpuffer	18,17g Tris (1,5M Tris Base)	8,8
	+2ml 20% SDS (0,4% SDS)	
	auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen	

Tabelle 8: Liste verwendeter Puffer und Lösungen

2.1.9.Software

Programm	Hersteller
7500 Fast System Software	Applied Biosystems by Life Technologies
	(Waltham, USA)
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss (Jena, D)
BD FACS Diva [™] Software 8.0.1	Becton Dickinson (Frankin Lakes, USA)
Benchling platform	Benchling Inc. (San Francisco, USA)
ChemoStar Imager	INTAS Science Imaging (Göttingen, D)
Citavi 6.3	Swiss Academic Software GmbH
	(Wädenswil, CH)
FlowJo TM v10.8.1	FlowJo LLC (Ashland, USA)
Graph Pad Prism 9.4.0	GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of
	Health (Maryland, USA)
Intas GDS	INTAS Science Imaging (Göttingen, D)
Windows 10 Pro	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

Tabelle 9: Liste verwendeter Software

2.1.10. Zelllinien

Während der gesamten Arbeit wurden die kolorektalen Tumorzelllinien HCT-116 und RKO verwendet. HCT-116 entstammen aus einem männlichen Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Zellen der Zelllinie RKO wurden aus einem Patienten mit Kolonkarzinom gewonnen. Die Zellen wurden bei der Firma CLS Cell Line Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) und American Type Culture Collection (LGC Standards, Wesel, Germany) erworben.

2.2. Methoden

2.2.1.Zellkultur

2.2.1.1. <u>Auftauen von Zellen</u>

Die für die folgenden Arbeiten verwendeten Zelllinien wurden im flüssigen Stickstoff bei -196°C gelagert. Zum Auftauen wurde ein Aliquot erwärmt und in eine T75 Zellkulturflasche mit Vollmedium überführt. Die Flasche wurde anschließend im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 gelagert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.1.2. Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden in DMEM bzw. RPMI +10% FCS + 1% P/S bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Sobald diese eine Konfluenz von etwa 80 – 100% erreicht hatten, wurden sie passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe der Serinprotease Trypsin gelöst. Diese Reaktion wurde nach wenigen Minuten durch eine kompetitive Hemmung durch FCS im Vollmedium abgestoppt. Ein Bruchteil dieser Zellsuspension wurde dann in eine neue, mit frischem Zellkulturmedium befüllte T75 Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.3. <u>Aussaat von Zellen</u>

Am Anfang jedes Versuches wurden Zellen in den jeweiligen Platten, Schalen oder Flaschen ausgesät. Hierfür wurden die Zellen, nachdem die Dauerkultur passagiert wurde, in einer Neubauer Zählkammer gezählt, um eine adäquate Zellzahl und Konfluenz am Ende des Versuches zu erreichen. Die Zellen in allen vier Quadranten der Zählkammer wurden gezählt, gemittelt und mit dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

2.2.1.4. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst durch Trypsin aus der Zellkultur Flasche gelöst und in Vollmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten sedimentiert, das Pellet mit DPBS gewaschen und anschließend in FCS + 10% DMSO aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Diese Kryogefäße wurden dann für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert. Abschließend wurden die in Kryogefäßen befindlichen Zellen von -80°C in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt und dort gelagert.

2.2.2.PEI-Transfektion

Um Zellen mit Plasmiden zu transfizieren, wurde das Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) benutzt. PEI ist ein kationisches Polymer, das die DNA in positiv geladenen Partikel kondensiert, die dann an die anionischen Partikel der Zellmembran binden können und durch Endozytose aufgenommen werden (Longo et al. 2013). Für die Transfektion wurde pro Well in Low Binding Gefäßen 100µl Medium ohne FCS mit 4µl PEI gemischt. In einem zweiten Low Binding Gefäß wurde ebenfalls 100µl Medium ohne FCS vorgelegt und die jeweilige Menge Plasmid hinzugefügt. Beide Ansätze wurden fünf Minuten inkubiert und anschließend gemischt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation. In dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel in den Platten, in denen am Tag zuvor Zellen ausgesät wurden, durchgeführt. Nach der Inkubation wurde Transfektionsmix tröpfchenweise zu den Wells pipettiert. Am darauffolgenden Tag fand ein Mediumwechsel statt.

2.2.3. Lipofectamine® RNAiMax-Transfektion

Für eine Transfektion von Zellen mit siRNA wurde das Lipofectamine® RNAiMax Reagent verwendet. Das Transfektionssystem basiert auf kationischen Lipiden. Diese Lipide binden das negativ geladene Phosphatrückgrat der siRNAs und bilden kationische Liposomen. Die positiv geladenen Liposomen werden dann durch Endozytose an der negativ geladenen Zellmembran in die Zellen aufgenommen (Berardo et al. 2019). Sobald die zuvor ausgesäten Zellen eine adäquate Konfluenz erreicht hatten, wurde in Low Binding Gefäßen 2µl Lipofectamine® RNAiMax Reagent mit 150µl Medium ohne FCS gemischt. In einem zweiten Low Binding Gefäß wurde zu 150µl Medium ohne FCS 1,15µl siRNA [20µM] hinzu pipettiert. Die weitere Vorgehensweise gleicht der PEI Transfektion (s. Punkt 2.2.2).

2.2.4.<u>MTT-Assay</u>

Der MTT-Assay dient zur Quantifizierung der Viabilität und des Metabolismus von Zellen. Dabei wird das gelbe, wasserlösliche MTT reduziert, was im wasserunlöslichen, violett-blauen Formazan resultiert (Ghasemi et al. 2021). Für diese Quantifizierung wurden 90 μ l MTT-Reagenz zum Medium in den Wells der 6-Well-Platten hinzugefügt und für 60 – 90 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 400 μ l MTT-Solubilisierungslösung hinzugefügt, um das wasserunlösliche Formazan zu solubilisieren. 200 μ l der nun violetten Lösung wurden in eine 96-Well Mikrotestplatte überführt und im Photometer bei 570nm kolometrisch gemessen.

2.2.5.BrdU-Assay

Mithilfe des BrdU-Assays lässt sich kolometrisch Zellproliferation quantifizieren. Dabei wird bei der DNA-Synthese das Thymidin-Analog Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen eingebaut, was anschließend immunchemisch nachgewiesen werden kann.

Für diesen Versuch wurden Zellen in einer 96-Well-Platte (ViewPlate-96 Black) ausgesät, sodass sie am Tag der Messung eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten. Es wurden je Kondition Triplets und eine Hintergrundkontrolle ausgesät. Am Tag nach dem Aussäen der Zellen wurden die Zellen mit dem VCP-Inhibitor CB5083 (180nm für HCT-116; 275nM für RKO) bzw. DMSO behandelt. Nach 72 Stunden wurde der BrdU-Assay durchgeführt.

Zunächst wurde das Medium aus der ViewPlate-96 Black Platte abgesaugt und durch eine BrdU-Lösung (1: 1000) ersetzt und für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Hintergrundkontrolle pipettiert. Nachdem die Inkubationszeit abgelaufen war, wurde die BrdU-Lösung abgesaugt. Die nun markierten Zellen wurden für 30 Minuten mit Fixierungslösung fixiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einer anti-BrdU Antikörperlösung (1: 1000). Nach dreimaligem Waschen der Zellen, wurde die Substratlösung angesetzt (1:100) und für 15 Minuten auf dem Kippschüttler gemischt. Anschließend wurden 100µl/Well pipettiert und die Platte für drei Minuten auf dem Kippschüttler inkubiert. Abschließend wurde die Absorption im Luminometer gemessen.

2.2.6. RNA-Isolation

Für die RNA-Gewinnung wurden zunächst Zellen in 6-Well-Platten so ausgesät, dass sie am Tag der Ernte eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht hatten. Vor der Lyse der Zellen wurde das Medium aus den jeweiligen Wells abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte bei -20°C gelagert bis die RNA isoliert werden sollte. Hierfür wurde 350µl Lysepuffer direkt in die Wells gegeben und für ca. fünf Minuten auf dem Kippschüttler lysiert. Darauffolgend wurde gemäß Herstellerprotokoll vorgegangen. Abschließend wurde die RNA-Konzentration am Nanodrop 1000 von Peqlab Technologies GmbH (Erlangen, D) ermittelt.

2.2.7. cDNA-Synthese

Um aus der zuvor isolierten RNA cDNA zu synthetisieren, wurde das Omniscript RT Kit (200) von Qiagen (Hilden, D) verwendet. In einem Eppendorf Gefäß wurden 1000ng RNA in 14,1µl Volumen aufgenommen und 5,9µl des folgenden Mastermix hinzugefügt:

1x Mastermix	
1µ1 A.dest	
0,5µl Reverse Transkriptase	
2µ1 10x RT-Puffer	
2µ dNTPs [5Mm]	
0,4µl Oligo dT Primer [20µM]	

Tabelle 10: Mastermix cDNA Synthese

Anschließend wurde der fertige Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde dann bei -20°C gelagert.

2.2.8.<u>qPCR</u>

Die quantitative PCR (qPCR) oder real-time PCR erlaubt es mittels Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus Rückschlüsse auf die Menge der amplifizierten DNA zu ziehen (Kralik und Ricchi 2017). Dabei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in doppelsträngige DNA. Durch die nach jedem Amplifikationsschritt gemessene Fluoreszenz lässt sich die DNA-Menge ableiten (Mitchell 2003; Karlen et al. 2007).

Es wurde zunächst RNA isoliert (s. 2.2.6) und anschließend in cDNA umgeschrieben (s.2.2.7). Die cDNA wurde dann 1:50 verdünnt. Es folgte das Ansetzen folgenden Mastermix:

1x Mastermix
10µl SYBR Green
4,6µ1 A. dest.
0,2µ1 Primer forward
0,2µ1 Primer reverse

Tabelle 11: Mastermix qPCR

15µl dieses Mastermix wurden dann in jedes Well der MicroAm Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml von Applied Biosystems (Foster Coty, USA) pipettiert. Zu diesem Mastermix wurde dann 1µl der 1:50 verdünnten cDNA pipettiert. Pro Probe wurde eine Doppelbestimmung pipettiert. Als Referenz diente das Housekeeping Gene Ribosomal Protein Large P0 (RPLP0). Abschließend wurde die Platte durch
eine Klebefolie verschlossen, sodass es zu keiner Kontamination der Proben oder Kondensation kommen kann. Nach einer Zentrifugation, um den gesamten Inhalt der Wells am Boden zu vereinen, wurde die Platte in 7500 Fast Real Time PCR Systems von Applied Biosystems (Foster City, USA) gestellt und gemäß folgendem Ablauf gestartet:



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ablaufs eines qPCR Zyklus

Ausgewertet wurden die Daten anschließend über die $\Delta\Delta$ CT Methode. Dabei wurden zunächst die Mittelwerte der Ct-Werte aus den Doppelbestimmungen gebildet und in folgende Gleichung eingesetzt:

$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen}$

Um dann die relative Expression zu ermitteln, wurde der zuvor ermittelte Wert für ΔCt in

 $2^{-\Delta Ct}$

eingesetzt.

2.2.9. Western Blot

2.2.9.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Für den Nachweis von Proteinen wurden Western Blots durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Lysate aus Zellpellets erstellt. Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und zum gewünschten Zeitpunkt durch

Trypsinierung geerntet. Die Zellsuspension wurde dann für 5 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert, das entstandene Pellet mit PBS gewaschen und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Diese Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Lyse bei -20°C eingefroren.

Das Pellet wurde dann je nach Größe in dem jeweiligen Volumen (30-80µl) an Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 2 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Um die Proteinkonzentration der Lysate zu ermitteln, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Hierfür wurde Bradfordlösung benutzt, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 enthält. Sobald Protein an diesen Farbstoff gebunden hat, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm, was sich am Photometer kolometrisch messen lässt (Bradford 1976). Es wurde eine Standardreihe mit 0 – 5µg BSA in Doppelbestimmungen pipettiert, indem in jedes Well einer Mikrotest Platte 96-Well Bradfordlösung, 1µl Lysepuffer und die 1 – 5 µl BSA [1µg/µl] pipettiert wurden. Daneben wurde in Einfachbestimmungen in jedes Well zur Bradfordlösung 1µl Probe pipettiert. Anhand der anschließend am Multiskan FC Photometer gemessenen Absorptionen der Standardreihe lässt sich eine Kurve erstellen. Diese Kurve dient dazu durch die gemessenen Absorptionen der Proben den Proteingehalt abzulesen, um gleiche Proteinmengen auf das Gel auftragen zu können. Die Proben wurden dann mit Ladepuffer, bestehend aus 4x SDS Ladepuffer und 1M DTT, versetzt und bis zur Benutzung bei -20°C eingefroren.

2.2.9.2. <u>SDS-Gelelektrophorese</u>

8-8	
Gel	Zusammensetzung
10% Gel	2,5ml Trenngel-Stock
	4,2ml A. dest.
	3,3ml Acrylamid
15% Gel	2,5ml Trenngel-Stock

2.5ml A. dest.

5ml Acrylamid

5ml ready-to-use Sammelgellösung

Es wurden je nach Größe der zu detektierenden Proteine 10% oder 15% Gele nach folgenden Rezepten gegossen:

Tabelle 12: Rezepte Polyacrylamid-Gele

Sammelgel

Zur Polymerisierung der Trenngele wurden je 25µl APS und 25µl TEMED hinzugefügt, zur Sammelgellösung wurden je 15µl APS und TEMED hinzugefügt. Für Proteine mit einer Größe bis ca. 70 kDa wurde ein 15% Gel verwendet, für Proteine ab 70kDa bis 180kDa 10% Gele. Sobald die Gele vollständig polymerisiert waren, wurden sie in die Gellaufkammern omniPage Mini Vertical Protein Electrophoresis System von Cleaver Scientific Inc. (Rugby, UK) eingespannt und mit 1x Laufpuffer befüllt. In eine der Taschen der Gele wurde zunächst der Pageruler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific Inc. (Waltham, USA) pipettiert, um später die Größe der detektierten Banden ermitteln zu können. In die restlichen Taschen wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben pipettiert, nachdem sie für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht wurden. Die Gellaufkammern wurden an das Spannungsgerät PeqPower 300V Power Supply von Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, D) angeschlossen und bei 120V gestartet. Sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 160V erhöht. Sobald die Lauffront der Proben das Gel durchlaufen hatte und am Ende des Gels angekommen war, wurde die Spannung gestoppt.

2.2.9.3. <u>Blotting</u>

Um die mittels SDS-Gelelektrophorese zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu transferieren, wurden die Gele von den Scheiben gelöst und auf mit 1x Blottingpuffer durchtränkten Whatman Papieren in Blottingkasetten gelegt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und anschließend auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurde ein weiteres Whatman Papier gelegt und die Luftblasen rausgestrichen. Die Kassette wurde geschlossen und in die mit 1x Blottingpuffer gefüllte Blottingkammer gesteckt. Die Blottingkammer wurde an das Spannungsgerät PeqPower 300V Power Supply von Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, D) angeschlossen und eine Stromstärke von 300 mA angelegt. Je nach Größe der zu transferierenden Proteine variiert die Dauer des Blottingprozesses.

2.2.9.4. <u>Antikörper-Färbung</u>

Nachdem die Proteine auf die Membran übertragen wurden, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Milchpulverlösung geblockt, um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu minimieren. Anschließend wurde die Milchpulverlösung verworfen und durch die jeweilige Antikörperlösung ersetzt. Die Membran mit Primär-Antikörperlösung wurde über Nacht in den Kühlraum auf den Kippschüttler See-saw Rocker SSL4 von Stuart Equipment (Stafforshire, UK) gestellt. Am nächsten Tag wurde die Primär-Antikörperlösung wieder eingefroren und die Membran für je 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit Sekundär-Antikörperlösung auf dem Kippschüttler. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Sekundär-Antikörper verworfen und die Membran erneut drei Mal mit 1x TBST gewaschen. Als Referenzprotein wurde β -Aktin verwendet. Die Membran mit dem bereits mit HRP-gekoppelten Antikörper wurde für eine Stunde bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert. Es folgte erneut dreimaliges waschen für je 10 Minuten mit 1x TBST.

2.2.9.5. Detektion der Proteine

Je nach Antikörper wurde zur Entwicklung Clarity Max Western ECL Substrate oder Clarity Western ECL Substrate von Biorad (Kalifornien, USA) verwendet. Hierfür wurden die beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und ein Milliliter auf einer Membran verteilt und für eine Minute bei RT inkubiert. Die Membranen wurden anschließend zwischen zwei Folien gelegt, die Luftblasen entfernt und in den ChemoCam Imager von Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D) gelegt. Nachdem das Bild scharf gestellt wurde, wurde das Bild für einige Sekunden bis Minuten beleuchtet und das entstandene Bild gespeichert. Zur Quantifizierung wurde ImageJ von Wayne Rasband, National Institutes of Health (Maryland, USA) verwendet.

2.2.10. <u>yH2AX-Färbung</u>

yH2AX ist ein Marker für DNA-Doppelstrangbrüche. DNA-Doppelstrangbrüche initiieren die DNA-Reparaturmaschinerie, die sowohl DNA-Reparaturmechanismen als auch die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 inkludiert (Noubissi et al. 2021; Rogakou et al. 1998). Für dieses Assay wurden zunächst Zellen auf autoklavierten Deckgläsern in 6-Well-Platten ausgesät. Es folgte die Behandlung mit Mitomycin C (MMC), einer alkylierenden Substanz, die in diesem Fall als Positivkontrolle fungierte. Neben MMC wurden die Zellen mit dem VCP-Inhibitor CB5083 behandelt. 24 und 48 Stunden nach Behandlung wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf dem Kippschüttler mit 1ml 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde 1ml -20°C Methanol in die Wells pipettiert, eine Minute auf dem Kippschüttler inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte eine zehn minütige Inkubation mit TBS 0,5% Triton-X100. Nachdem die Zellen für 30 Minuten in 2% BSA in 0,5% TBS-Triton-X100 gewaschen wurden, wurde der Primär-Antikörper α-γH2AX 1:200 in 2% BSA in 0,5% TBS-Triton-X100 verdünnt und 100µl auf jedes Deckglas pipettiert. Um Austrocknen und Kontamination zu verhindern, wurden die mit Antikörper bedeckten Deckgläser mit zugeschnittenem Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden der Parafilm und die Antikörperlösung entfernt und die Deckgläser drei Mal für je fünf Minuten mit 2% BSA in 0,5% TBS-Triton-X100 gewaschen. Der mit einem Fluorophor konjugiertem Sekundär Antikörper wird 1:500 in 2% BSA in 0,5% TBS-Triton-X-100 verdünnt und für zwei Stunden im Dunklen bei RT auf den Zellen inkubiert. Nach dem der Sekundär-Antikörper verworfen wurde und die Zellen erneut gewaschen wurden, wurde ein Tropfen Roti®mount Fluor Care DAPI von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas aus den Wells auf den Tropfen DAPI gegeben. Nachdem der Objektträger getrocknet ist, können die Zellen am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Es wurden verschiedene Bilder aufgenommen und die Foci Anzahl mittels ImageJ von Wayne Rasband, National Institutes of Health (Maryland, USA) quantifiziert.

2.2.11. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es die Größe, Granularität, Viabilität und Zellzyklusstatus der Zellen anhand Streuung von Licht und Emission von Fluoreszenz zu ermitteln. Dabei werden die Zellen von dem Gerät aufgenommen und einzeln mittels Laser analysiert. Sobald der Laser auf eine Zelle trifft, wird das Licht vorwärts- und seitwärtsgestreut. Das vorwärtsgestreute Licht (Forward Scattered Light; FSC) lässt Rückschlüsse auf die Größe der analysierten Zelle zu, das seitwärtsgestreute Licht (Sideward Scattered Light; SSC) hingegen auf Granularität und Morphologie der Zelle. Des Weiteren können verschiedene Marker, Proteine oder Zellkomponenten durch Fluoreszenz gefärbt und analysiert werden. Durch verschiedene Spiegel und Filter können verschiedene Wellenlängen zu den richtigen Detektoren gelenkt werden (Manohar et al. 2021).

2.2.12. Apoptose-Analyse: Annexin V-PI- Färbung

Um den programmierten Zelltod nachzuweisen, wurden Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dabei bindet Annexin V an Phosphatidylserin (PS), das während der Apoptose vom Zellinneren auf die äußere Zellmembran translokalisiert wird (Liu et al. 2009; Reutelingsperger und van Heerde 1997). PI hingegen ist ein fluoreszierendes Reagenz, das Nukleinsäuren bindet. Da während der Apoptose oder Nekrose die DNA der Zellen fragmentiert wird, ergibt sich bei der Analyse am Durchflusszytometer nach PI-Färbung für apoptotische bzw. nekrotische Zellen eine hypodiploide subG1-Fraktion, die sich wesentlich von nicht-apoptotischen Zellen unterscheidet (Riccardi und Nicoletti 2006). Bei einer Doppelfärbung mit Annexin V und PI ergeben sich also folgende drei möglich gefärbte Zellpopulationen: Annexin V-positive/ PI-negative Zellen, Annexin V-negative/PI-positive Zellen und Annexin V-positive/PI-positive Zellen. Dabei stellt die erste Population die frühapoptotischen Zellen dar, die zweite Fraktion die nekrotischen Zellen und die doppelpositive Population spätapoptotische Zellen.

Zur Färbung wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit CB5083 bzw. DMSO behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, indem sie trypsiniert wurden und die Suspension in FACS-Röhrchen bei 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert wurden. Dabei war zu beachten, dass der Überstand aus den Wells zur Suspension gegeben werden musste, da sich apoptotische Zellen im Überstand befinden können. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1ml PBS

gewaschen. Für Einzelfärbungen wurden je 100µl aus jeder Probe in ein neues FACS-Röhrchen überführt und vereinigt, um am Ende eine ungefärbte Kontrolle, eine Annexin V einzelgefärbte Kontrolle und eine PI einzelgefärbte Kontrolle zu erhalten. Diese Einzelfärbungen ermöglichen eine Kompensation bei Überschneidungen der Emissionsspektren.

Nach einer erneuten Zentrifugation der Proben und Kontrollen wurden die Zellen folgendermaßen gefärbt:

Annexin V-PI-Färbung	Annexin V -	PI-Einzelfärbung	ungefärbte Kontrolle
	Einzelfärbung		
100µ1 Annexin V-	100µ1 Annexin V-	100µ1 Annexin V-	100µ1 Annexin V-
Puffer	Puffer	Puffer	Puffer
5µl FITC Annexin V	5µl FITC Annexin V		
[90µg/ml]	[90µg/ml]		
5µl PI [1mg/ml]		5µl PI [1mg/ml]	

Tabelle 13: Durchflusszytometrie Färbeprotokolle Apoptose Analyse

Die Zellpellets wurden in den jeweiligen Färbelösungen resuspendiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Färbung durch Zugabe von 400µl Annexin V-Puffer gestoppt. Anschließend folgte die Messung am BD FACS Canto II. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo.

2.2.13. Zellzyklus-Analyse: PI-Färbung

Wie in Punkt 2.2.12 bereits erwähnt, bindet der Fluoreszenzfarbstoff PI DNA. Daher ist es möglich durch eine Färbung mit PI den DNA-Gehalt der Zellen festzustellen und über den DNA-Gehalt zu ermitteln, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befinden. Um sich die Veränderungen des Zellzyklus und einen möglichen Zellzyklusarrest zu einem gewissen Zeitpunkt genauer anschauen zu können, wurde der Zellzyklus mittel Nocodazol synchronisiert. Nocodazol ist ein synthetisches Benzimidazol, welches die Mikrotubuli bindet, den Anbau weiterer Untereinheiten verhindert und die Depolymerisierung fördert. Somit wird ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase hervorgerufen.

Hierfür wurden erneut Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde 2µl Nocodazol [100µg/ml] in das Medium der RKO Zellen gegeben, um eine Endkonzentration von 0,1µg/ml zu erreichen. Es folgte eine 24 stündige Inkubation. Die HCT-116 Zellen wurden nach ca. 36h für 12h mit Nocodazol behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit mit Nocodazol wurden die Zellen in FACS-Röhrchen geerntet und die Suspension für fünf Minuten bei 1500 rpm gewaschen. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend mit -20°C kaltem 70% Ethanol fixiert, indem 700µl des Ethanols tröpfchenweise unter Vortexen auf das Pellet gegeben

wurden. Die Zellen können dann bis zu drei Monate bei -20°C gelagert werden. Nach mindestens fünf Minuten bei -20°C wurden die Zellen erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Für die darauffolgende PI-Färbung wurde PI-Puffer angesetzt:

15ml PI-Puffer= 15ml PBS + 75µl RNase A [10mg/ml] + 300µl PI [1mg/ml]

Das Zellpellet wurde in 500µl PI-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte die Messung am BD FACS Canto II und die Auswertung mittels FlowJo.

2.2.14. Seneszenz-Analyse: SA-βGal-Färbung

Um zu testen, ob ein VCP-Knockdown Seneszenz induziert, wurde mittels Durchflusszytometrie die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β Gal) als verbreiteter Seneszenzmarker gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit dem Inhibitor der lysosomalen β-Galaktosidase Bafilomycin A1 und dem Substrat der SA-βGal C₁₂FDG inkubiert. Bei Aktivität der SA-βGal kommt es zur Hydrolyse des Substrats, wodurch dieses messbar fluoresziert (Debacq-Chainiaux et al. 2009). Für die Untersuchung wurden die Zellen zunächst in 24-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit DMSO bzw. CB5083 behandelt. Nach 96h wurde zunächst das Medium aus den Wells abgenommen und durch 200µl FCS-freies Medium ersetzt. Der abgenommene Überstand wurde für fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50µl FCS-freiem Medium aufgenommen und in das Medium in den Wells pipettiert. Bafilomycin A1 wurde hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 100nM entstand. Nach exakt einer Stunde wurde das SA-βGal Substrat C12FDG in einer Endkonzentration von 50µM in die Wells pipettiert. Nach einer weiteren Stunde wurde der Überstand aus den Wells in FACS-Röhrchen überführt, der Zellrasen zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen trypsiniert. Die gesamte Zellsuspension samt Überstand und PBS wurde für fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert und das Pellet in 100µl eiskaltem PBS aufgenommen. Anschließend folgte die Messung am Beckman Coulter CytoFLEX LX6 und die Auswertung mittels FlowJo.

2.2.15. Auswertung und Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mittels Graph Pad Prism 9.4.0 und Microsoft Excel. Für die Gruppenvergleiche wurden das arithmetische Mittel (MW) und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Zur statistischen Auswertung wurden die Versuchsgruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test analysiert. Signifikanz wurde mit Sternchen (*), ein Nichtvorliegen einer Signifikanz mit ns (nicht signifikant) gekennzeichnet, wobei das Signifikanzniveau bei p > 0,05 lag. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Inhibitoren

Um mit den Versuchen beginnen zu können, musste erst die Arbeitskonzentration der VCP-Inhibitoren CB5083 und NMS873 und der Kontrolle MMC ermittelt werden. Hierzu wurden die Zellen mit absteigenden Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt und eine Überlebenskurve gefertigt. Dies erfolgte über MTT-Assays. Die letztliche Arbeitskonzentration entspricht der Konzentration, bei der eine 50% Viabilität der Zellen vorhanden ist.



Abbildung 7: Etablierung der Inhibitoren Darstellung der MTT-Assays als Überlebenskurven von HCT-116 und RKO Zellen nach 72h MMC-, CB5083- und NMS873-Behandlung. Darstellung der Mittelwerte ± Stabw; n=3.

Die Zellen der Zelllinie RKO zeigten unter NMS873-Behandlung eine verstärkte Resistenz und eine abnormale Dosis-Wirkungskurve, weswegen im Folgenden ausschließlich mit CB5083 gearbeitet wurde.

3.2. VCP-Inhibition via CB5083 und NMS873 induzieren DNA-Schäden

Ensteht ein Doppelstrangbruch der DNA als Folge von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren, kommt es schnell zur Phosphorylierung der Histon H2A Variante H2AX am Serinrest 139 (Mah et al. 2010).

Da VCP mit seiner Segregasefunktion auch bei der DNA-Reparatur nach Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, wurde zunächst der Effekt eines Inhibtor-vermittelten VCP-Knockdowns auf die Induktion von DNA-Schäden in den Zellen untersucht.

Hierfür wurden die Zellen mit den VCP-Inhibitoren CB5083 behandelt und mittels fluoreszierenden Antikörpern die Bildung von γH2AX-Foci als DSB-Marker angefärbt. Neben den Inhibitoren wurde die alkylierende Substanz Mitomycin C als Positivkontrolle verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und ImageJ, die Quantifizierung mittels GraphPad Prism (Abb. 8).





Abbildung 8: γ H2AX-Färbung nach VCP-Inhibition (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der γ H2AX-Färbung 24h und 48h nach MMC- und CB5083-Behandlung. Blau= DAPI; Grün = γ H2AX; 63x Vergrößerung; Größenbalken = 20 μ m (B) Quantifizierung der Zellen mit >10 Foci/ Nukleus mittels GraphPad Prism. Die Balken stellen den Mittelwert ± Stabw. dar; n=4. Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit unbehandelter Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001,

Die Färbung zeigt sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden eine deutliche Zunahme an Zellen mit mehr als 10 Foci/Nukleus, also der γ H2AX-positiven Zellen. Die Zellen der Zelllinie HCT-116 weisen nach 24 Stunden bereits eine Erhöhung der γ H2AX-positiven Zellen von ca. 31% für CB5083 auf. Nach 48 Stunden weisen die CB5083-behandelten HCT-116 Zellen ca. 36% γ H2AX-positive Zellen auf. Auch die Behandlung der RKO Zellen mit dem Inhibitor erhöht den Anteil der γ H2AX-positiven Zellen um etwa 34% nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war hier ein Anstieg von 41% zu verzeichnen.

Insgesamt konnte also für beide Zelllinien eine deutliche Induktion von DSB nach VCP-Knockdown verzeichnet werden.

3.3. VCP-Knockdown induziert Apoptose und Nekrose

Um die Folgen der zuvor dargestellten DSB zu eruieren, wurden zunächst Apoptose-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde einerseits der Apoptosemarker PARP via Western Blots analysiert, anderseits wurden auch Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt, die darstellen sollen, in welcher Phase der Apoptose (späte oder frühe Apoptose) oder Nekrose sich die Zellen befinden. Dies wurde durch eine Annexin V–PI-Doppelfärbung erreicht. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels

ImageJ und GraphPad Prism, die Auswertung der Durchflusszytometrie-Analysen mittels FlowJo und GraphPad Prism. Jede Probe wurde auf die jeweilige β -Aktin Probe normalisiert. Für die siRNAs wurde siK als Kontrolle und zur Normalisierung herangezogen, für den Inhibitor CB5083 diente DMSO als Kontrolle und Normalisierung.

Betrachtet man im Western Blot das Verhältnis von gespaltenem PARP zur Gesamtmenge PARP, sieht man für die Zelllinie HCT-116 eine deutliche Erhöhung an gespaltenem PARP nach siVCP1 Transfektion. Auch siVCP3 und der Inhibitor verstärken die Spaltung von PARP um über 100% bzw. etwa 70%.

In RKO Zellen kam es zu einer moderaten Steigerung der PARP Spaltung nach der Transfektion mit allen drei siRNAs. Allerdings führte die Behandlung mit CB5083 zu einem starken Anstieg an gespaltenem PARP.

Die Behandlung mit dem VCP-Inhibitor CB5083 führte in der Durchflusszytometrie-Analyse in HCT-116 Zellen zu einer Verdopplung der frühapoptotischen Zellen, allerdings lediglich auf 5,2%. Der Anteil der nekrotischen Zellen hingegen stieg um 9% auf 12,6%. Nach 72 Stunden wurde allerdings schon in 8,2% der Zellen die frühe Apoptose induziert, in 16,3% die Nekrose. Auch der Anteil der spätapoptotischen Zellen stieg an, allerdings lediglich auf etwa 2% nach 48 Stunden und 3,2% nach 72 Stunden.

In der Zelllinie RKO war nach 48 Stunden kaum ein Unterschied der einzelnen Phasen nach Inhibitorbehandlung verglichen mit DMSO zu sehen. Nach 72 Stunden verdreifachten sich die frühapoptotischen Zellen, die nekrotischen Zellen verfünffachten sich sogar. Allerdings blieb der Anteil der frühapoptotischen Zellen nur bei etwa 3%, die nekrotischen Zellen machten 7,3% aus.

Diese Ergebnisse zeigten, dass es sowohl zu einer leichten Induktion der Apoptose, als auch der Nekrose zu kommen scheint. Im Western Blot scheint sowohl der Inhibitor als auch vor allem siVCP1 und 3 in beiden Zelllinien eine Spaltung von PARP und somit den initialen Schritt der Apoptose einzuleiten. In der Durchflusszytometrie zeigt sich ebenfalls eine Vermehrung der frühapoptotischen Zellen sowohl in RKO als auch in HCT-116 Zellen. Allerdings zeigt diese Analyse vor allem vermehrt nekrotische Zellen in beiden Zelllinien. Alles in allem ist allerdings weder der Anteil der apoptotischen Zellen noch der Anteil der nekrotischen Zellen so hoch, wie man es nach der eindeutigen Initiierung von DNA-Schäden, die sich in der γH2AX-Färbung gezeigt hatten, erwartet hätte.



A

RKO



Abbildung 9: Apoptose-Analyse nach VCP-Inhibition. (A) Western Blot 48h nach Transfektion/Behandlung, Primär-AK α -PARP. Darstellung eines repräsentativen Blots. (B) Quantifizierung der Western Blots mittels ImageJ und GraphPad. Darstellung der Mittelwerte ± Stabw., normalisiert auf siK bzw. DMSO. n=4 (C) Durchflusszytometrie-Analyse 48h und 72h nach Transfektion/Behandlung mittels Annexin V-PI-Doppelfärbung. Quantifizierung mittels GraphPad Prism; n=4. Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit siK- bzw. DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001,

3.4. VCP-Knockdown führt zu Proliferationsinhibition und Zellzyklusarrest

Durch die zuvor erlangten Erkenntnisse lag der Verdacht nahe, dass es zu einer Proliferationsinhibition durch den VCP-Knockdown kommt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde ein BrdU-Assay durchgeführt (Abb. 10).



Abbildung 10: VCP-Inhibition hemmt Proliferation BrdU-Assay 48h und 72h nach CB5083-Behandlung. rlu/s = relativelight units per second; n=4 Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism, Darstellung der Mittelwerte ±Stabw., Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, *für $p \le 0,05$, **für $p \le 0,01$, *** für $p \le 0,001$, **** für $p \le 0,0001$

Dieses Assay zeigte eine eindeutige Reduktion von Bromdesoxyuridin, somit eine Reduktion der proliferierenden Zellen nach CB5083-Behandlung in HCT-116, sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden. Dabei ist nach 72 Stunden eine relative Proliferationsinhibition von 88% zu verzeichnen.

In RKO Zellen war dieser Effekt nicht so deutlich wie in HCT-116 Zellen zu beobachten. Allerdings konnte auch hier eine Inhibition von 28% erreicht werden.

Diesen Ergebnissen könnte ein Zellzyklusarrest zugrunde liegen, der zu einer Proliferationsinhibition der Zellen führen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren via qPCR und Western Blot untersucht (Abb. 11 A und B).







Abbildung 11: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown (A) qPCR 24h und 48h nach CB5083-Behandlung; n=4 (B) Western Blot 48h nach CB5083-Behandlung auf angegebene Marker; n=3. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism, Darstellung der Mittelwerte ±Stabw. Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für $p \le 0,05$, ** für $p \le 0,01$, *** für $p \le 0,001$, **** für $p \le 0,0001$

Dabei zeigte die qPCR-Analyse von 15 Zellzyklus-assoziierten Genen eine Expressionserhöhung bzw. -verminderung. Dabei kam es nach VCP-Knockdown zu einer erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren *p15, p18, p19, p21, p27* und der Transkriptionsfaktoren *E2F3, 5, 6* und 7. Die Transkriptionsfaktoren *E2F2, E2F4* und *E2F8* und der Zellzyklusregulator *Cyclin D1* hingegen wurden nach CB5083-Expression tendenziell vermindert exprimiert.

Im Western Blot wurde eine erhöhte Proteinexpression von p21, Cyclin D1 und Cyclin E sichtbar (Abb. 10 B; Abb. A1). Somit zeigten beide Assays eine verstärkte Expression des Zellzyklusinhibitors p21, was vermuten lässt, dass der Zellzyklus in seinem Ablauf gehemmt ist.

Um die vermutete Hemmung des Zellzyklus genauer zu beleuchten, wurden die Zellen mit PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 12). Diese Färbung ermöglicht eine genauere Analyse der einzelnen Zellzyklusphasen.



Abbildung 12: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown mittels Durchflusszytometrie PI-Färbung 48h nach Behandlung, Analyse im Durchflusszytometer; n=4 Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism, Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw., Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,001

Diese Analyse zeigte allerdings weder für HCT-116 noch für RKO Zellen große Unterschiede verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Lediglich für die Zellen der Zelllinie RKO konnte eine leichte Erhöhung von etwa 12% der G1-Phase nach CB5083-Behandlung verzeichnet werden.

Im nächsten Schritt wurde die Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie wiederholt, allerdings wurden die Zellen vor Analyse mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol für 12 bzw. 24 Stunden behandelt (Abb. 13). Nocodazol führt zu einem M-Phasen / G2-Phasen Arrest.



Abbildung 13: Zellzyklus-Analyse nach VCP-Knockdown nach Nocodazol-induziertem G2-Arrest 48h nach Behandlung 12h (HCT-116) bzw. 24h (RKO) Nocodazol Zugabe, anschließende PI-Färbung und Durchflusszytometrie; n=5. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism, Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw. Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,001, **** für p≤0,001

Dabei zeigte sich, dass die unbehandelten und DMSO-behandelten HCT-116 und RKO Zellen wie erwartet in G2 arretieren und sich das Zellzyklusprofil nach Nocodazol-Behandlung von der G1-Phase

in Richtung G2-Phase verschiebt. Die CB5083-behandelten Zellen hingegen zeigten keinen eindeutigen G2-Arrest, sondern ein sehr ausgeglichenes Phasenprofil. Dabei kam es zwar zu einem leichten Rückgang der G1- und S-Phase und einer leichten Erhöhung der G2-Phase nach Nocodazolgabe, allerdings ist die Phasenverteilung sehr ähnlich und verglichen mit den DMSO-Kontrollen ist der Anteil an in G2-befindlichen Zellen deutlich geringer.

Dieses Ergebnis, zusammen mit den Ergebnissen der BrdU-, der Western Blot- und qPCR-Analyse und der vorherigen Zellzyklus-Analyse legt nahe, dass ein CB5083-vermittelter VCP-Knockdown zu einer ganzheitlichen Inhibition des Zellzyklus und somit auch zu einer Proliferations- und Wachstumsinhibition führt.

3.5. VCP Herunterregulierung induziert Seneszenz

Ein Grund für die initiierte Proliferations- und Wachstumsinhibition könnte in der Induktion von Seneszenz liegen. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Zellen nach 96 stündiger Inhibitor- bzw. DMSO-Behandlung mit Bafilomycin A1 und dem Substrat der SA- β Gal C₁₂FDG inkubiert und anschließend die SA- β Gal Aktivität im Durchflusszytometer quantifiziert.



Abbildung 14: Induktion der Seneszenz 96h nach DMSO- bzw. CB5083-Behandlung Inkubation mit Bafilomycin A1 und C₁₂FDG, anschließende Durchflusszytometer-Analyse, n=3. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism, Darstellung der Mittelwerte ±Stabw. Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,001

Die Analyse zeigte eine deutliche Induktion der Seneszenz für beide Zelllinien nach Inhibitorvermittelter VCP-Inhibition. In HCT-116 Zellen führte die 96 stündige Inkubation mit CB5083 zu etwa 11% mehr seneszente Zellen verglichen mit der DMSO-Kontrolle. In RKO Zellen hingegen ist der Effekt ebenfalls vorhanden. Hier kommt es zu einer Steigerung der seneszenten Zellen um etwa 7% auf 7,33%.

3.6. VCP spielt keine Rolle bei Autophagie-Induktion in kolorektalen Karzinomzellen

Ein weiterer zellulärer Prozess, bei dem VCP eine Rolle spielt, ist die Autophagie. Dabei werden Zellbestandteile wie fehlgefaltete Proteine oder Zellorganellen zur Energiegewinnung degradiert und recycelt.

Um zu analysieren, ob ein Knockdown von VCP Autophagie induziert oder hemmt oder welche Auswirkungen eine VCP-Defizienz auf den Ablauf der Autophagie hat, wurde in Western Blots die Expression der Autophagiemarker p62 und LC3 untersucht (Abb. 15).







Abbildung 15: Induktion der Autophagie. (A) Western Blot 48h nach CB5083-Behandlung; Primär-AK α -LC3 und α -p62. (B) Quantifizierung der Western Blots mittels ImageJ und GraphPad Prism. Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw., normalisiert auf DMSO-Kontrolle;. n=3; Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,0001 Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,001

Vergleicht man die Expressionsstärken von LC3-I und LC3-II sind nur geringe Unterschiede sichtbar. In HCT-116 Zellen lässt sich allerdings nach 48 Stunden ein LC3-II-Anstieg von etwa 120% nach CB5083-Behandlung verglichen mit DMSO-behandelten HCT-116 Zellen darstellen. In den Zellen der Zelllinie RKO hingegen ist kaum eine Erhöhung der LC3-II-Expression messbar, 48 Stunden nach Behandlung ist sogar eine Verringerung der LC3-II-Expression von ca. 8% messbar.

Für p62 sind ebenfalls kaum Veränderungen der Expressionsstärken zu erkennen. In HCT-116 Zellen ist die p62-Expression 48 Stunden nach CB5083-vermitteltem VCP-Knockdown um etwa 19% verringert, nach 24 Stunden hingegen ist ein Anstieg von etwa 9% zu verzeichnen. In RKO Zellen ist p62-Expression kaum verändert. Nach 24 Stunden ist lediglich ein vier prozentiger, nach 48 Stunden ein fünf prozentiger Expressionsanstieg zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass in HCT-116 Zellen 48 Stunden nach Inhibitorbehandlung eine sehr leichte Induktion der Autophagie stattfinden könnte. In RKO Zellen hingegen liegt kein Hinweis auf eine Initiierung der Autophagie vor.

3.7. VCP verhindert Ubiquitinierung

Um die Funktion von VCP im Ubiquitin-System in kolorektalen Tumorzellen zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt und mit einem α -Ubiquitin-Antikörper die Ubiquitin-Expression nach siRNA-Transfektion und VCP-Inhibitorbehandlung quantifiziert (Abb. 16).

Es zeigte sich sowohl nach siVCP-Transfektion als auch nach CB5083-Behandlung ein deutlicher Anstieg an Ubiquitin im Western Blot sowohl für HCT-116 als auch für RKO Zellen (Abb. 11). Dabei erhöht sich die Ubiquitin-Expression in HCT-116 Zellen nach siVCP1-Transfektion um 46%, nach siVCP2-Transfektion um 36% und nach siVCP3-Transfektion um etwa 70% verglichen mit der siK-Kontrolle. Die VCP-Inhibition durch CB5083 lässt die Expression sogar um etwa 106% ansteigen. Die Ubiquitin-Expression verhält sich in RKO Zellen nach VCP-Inhibition ähnlich. Dabei ist ein Anstieg von 61%, 59% und 105% nach siVCP1-, 2- und 3-Transfektion zu verzeichnen. Der Inhibitor CB5083 lässt die Ubiquitin-Expression um 59% ansteigen. Es scheint also so, dass eine Inhibition von VCP eine stärkere Ubiquitinierung zulässt.







Abbildung 16: VCP inhibiert Ubiquitinierung. (A)Western Blot 48h nach CB5083-Behandlung, Primär-AK α -Ubiquitin (B) Quantifizierung der Western Blots mittels ImageJ und GraphPad Prism; .n=4; Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw., normalisiert auf siK- bzw. DMSO-Kontrolle; Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, *für p≤0,05, **für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,001

3.8. VCP-Knockdown initiiert Unfolded Protein System

Neben den bisher erwähnten Funktionen spielt VCP auch im *Unfolded Protein System* (UPS) eine grundlegende Rolle. Um zu untersuchen, ob VCP bzw. eine Inhibition von VCP das UPS und seine Signalkaskade triggert und initiiert, wurden qPCRs und Western Blots durchgeführt und Marker der verschiedenen UPS-Wege untersucht.





Abbildung 17: Induktion der UPR nach VCP-Inhibition. (A) qPCR auf ATF4 und ATF6 48h nach Behandlung/Transfektion; n=4 (B) Western Blot auf ATF4, ATF6 und gespaltenes ATF6 48h nach Behandlung/Transfektion. (C) Quantifizierung der Western Blots mittels ImageJ und GraphPad Prism; n=3. Darstellung der Mittelwerte ± Stabw. normalisiert auf siK- bzw. DMSO-Kontrolle; Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,0001 Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit DMSO-Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, **** für p≤0,001, **** für p≤0,001

Die qPCR-Analysen der HCT-116 Zellen auf den UPR-Marker *ATF4* zeigten eine Erhöhung von 51% 48 Stunden nach siVCP1-Transfektion, siVCP2 und siVCP3 führten zu einer Erhöhung von 46% und 37%. Der Inhibitor CB5083 erhöhte die *ATF4*-Expression auf RNA-Ebene um 31% nach 48 Stunden. 72 Stunden nach Tranfektion der siRNAs änderte sich die *ATF4*-Expression kaum. Die Behandlung mit dem VCP-Inhibitor dagegen führte nach 72 Stunden zu einer 85 prozentigen Erhöhung der *ATF4*-Expression.

Auch der UPR-Marker *ATF6* zeigte durch den siRNA- und Inhibitor-vermittelten VCP-Knockdown eine Expressionserhöhung. siVCP1 erhöhte die Expression um 74% nach 48 Stunden, um 104% nach 72 Stunden. Die Behandlung mit dem Inhibitor erhöhte die *ATF6*-Expression nach 72 Stunden um 109%.

In RKO Zellen kam es 48 Stunden nach CB5083 zu einer Erhöhung der *ATF4*-Expression um 71%. Die siRNA siVCP1 hingegen verringerte die Expression um 54%. Nach 72 Stunden zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression nach siVCP2-Transfektion um über 200%.

Für die Analyse der *ATF6*-Expression zeigte sich nach 48 Stunden kaum eine Erhöhung, auch nach 72 Stunden waren nur leicht erhöhte Expressionen zu verzeichnen. Die Transfektion mit siVCP1 erhöhte sich die *ATF6*-Expression um etwa 64%, siVCP2 und 3 um 36% und 39%, die Behandlung mit CB5083 hingegen verminderte die *ATF6*-Expression.

Im Western Blot zeigten die HCT-116 siRNA-transfizierten Zellen eine deutlich Erhöhte ATF4-Proteinexpression von 126%, 90% und 141% für siVCP1, 2 und 3. Der Inhibitor hingegen erhöhte die Expression um lediglich 18%. Eine ebenso deutliche Erhöhung zeigten die Marker ATF6 und cleaved ATF6. Hier war vor allem für das geschnittene ATF6, also das nach Induktion der UPR geschnittene zytosolische Fragment des ER-Stresssensors, eine stark erhöhte Expression sichtbar. Nach siVCP1- und siVCP2-Transfektion bewegte diese sich bei 225% und 140%, nach CB5083-Behandlung lediglich bei 32%. Die Transfektion mit siRNA siVCP3 induzierte verminderte geschnittene ATF6-Expressionen.

In RKO Zellen induzierten siVCP2 und 3 die ATF4-Expression, siVCP1 und der Inhibitor verringerten die Expressionen sogar. Für ATF6 kam es für jede siRNA zu verminderten ATF6-Expressionen, CB5083 induzierte die Expression nur minimal. Allerdings zeigten siVCP1 und vor allem der VCP-Inhibitor deutlich erhöhte Expressionen des zytosolischen Fragments von ATF6 von je 84% und 135%. Es scheint, dass es durch eine siRNA- und/oder Inhibitor-vermittelte VCP-Inhibition zu einer Induktion des ersten und dritten Arms der UPR kommt, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene.

4. Diskussion

In Pankreaskarzinom-bezogenen Vorarbeiten der AG Buchholz stellte sich in einem shRNA Library Screening *VCP* als potentielles Zielgen für zielgerichtete Therapieansätze dar. Darauf folgend wurden Viabilitäts-, Proliferations- und Apoptoseassays durchgeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von VCP in Pankreaskarzinom-Zelllinien mit signifikanter VCP Überexpression die Viabilität und Proliferation der Zellen inhibiert (Schimanski 2021).

Diese Arbeit befasste sich mit der Inhibition von VCP und dessen Auswirkungen auf Viabilität, Proliferation, Induktion von Apoptose, Zellzyklus und einigen anderen zellulären Vorgängen in kolorektalen Karzinomzellen. Im Zuge dessen wurden verschiedene Assays nach Inhibitor- und siRNAvermittelter VCP-Inhibition durchgeführt, die zeigen konnten, dass eine Herunterregulierung von VCP eine verminderte Viabilität und Proliferation, eine Induktion der Apoptose und Seneszenz, einen Zellzyklusarrest, die partielle Induktion der UPR und eine erhöhte Ubiquitinierung zur Folge hat.

Wie eine Datenbankanalyse der Datenbanken TCGA und GTEx mithilfe des Gepia2 Tools zeigt, ist VCP in kolorektalen Tumoren im Vergleich zu normalem, gesundem Gewebe überexprimiert (Abb. 5). In der Literatur wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten eine signifikante Überexpression von VCP beschrieben. Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, korreliert beispielsweise eine VCP-Überexpression in hepatozellulären Karzinomen mit dem Gesamt- und rückfallfreiem Überleben von Patienten, in Magenkarzinomen mit größeren Tumoren, vermehrter vaskulärer und lymphatischer Invasion, Lymphknotenmetastasierung und einer geringeren Überlebensrate und in Ösophaguskarzinomen mit häufigerem Lymphknotenbefall, Metastasierung, tieferer Invasion und vermehrten Rezidiven (Yamamoto et al. 2003b; Yamamoto et al. 2003a; Yamamoto et al. 2004a).

Für kolorektale Karzinome zeigt die Datenbankanalyse hinsichtlich Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben allerdings keine Verlängerung in der Patientengruppe mit geringerer VCP-Expression (Abb. 4). Dennoch zeigte eine Publikation aus 2016 von Fu et. al, dass eine lentivirale Inhibition von *VCP* in kolorektalen Krebszellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell Proliferation und Metastasierung inhibiert und Apoptose induziert (Fu et al. 2016). Yamamoto et. al zeigte in einer Studie aus 2004 an 129 Patienten, dass Patienten, denen operativ kolorektale Tumore entnommen wurden und die dann histologisch untersucht wurden, ein längeres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben aufwiesen bei geringerer VCP-Expression in den Tumoren und in den umliegenden Geweben (Yamamoto et al. 2004b). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen der oben erwähnten Datenbank Analyse. Es lässt sich aber anhand dieser Studie, die ebenfalls zeigte, dass die VCP-Expressionslevel mit der Metastasierung, der Invasionstiefe und der venösen Invasion korreliert, vermuten, dass die Expression von VCP als potentieller Bio- und Prognosemarker für kolorektale Karzinome fungieren könnte. Ob die Expression nun auch Aussagen über Überlebensprognosen liefern kann, ist damit nicht geklärt. VCP könnte trotz allem als Ziel für genauere Therapieansätze dienen. Diese

These wird unterstützt durch eine Publikation aus 2012. Hier konnte in einer Serumanalyse von Patienten mit Granulosazelltumoren gezeigt werden, dass VCP erhöht exprimiert wird. Diese Erkenntnisse konnten auch für Ovarialkarzinome, Brustkrebs, Kolon- und Pankreaskarzinome und Non-Hodgkin-Lymphome bestätigt werden. Weiter wurden Seren von Patienten mit CRC auf den verbreitesten Tumormarker für kolorektale Karzinome Carcino-embryonales Antigen (CEA) untersucht und festgestellt, dass 75% der Kolonkarzinome in späten Phasen positiv auf CEA sind. Alle diese Proben wurden ebenfalls positiv auf VCP getestet, weiter noch wurden zwei Proben, die negativ für CEA waren, positiv für VCP getestet (Laguë et al. 2012).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass VCP bei Überexpression und Involvierung in verschiedene zelluläre Mechanismen durchaus ein interessantes Therapie-Zielgen darstellen kann. Diese verschiedenen zellulären Mechanismen und Funktionen wurden in dieser Arbeit untersucht und werden im Folgenden diskutiert.

4.1. Viabilitätsinhibition und Zellzyklusarrest durch VCP-Knockdown

Diese Arbeit stellte VCP in kolorektalen Karzinomen in den Vordergrund. Es konnte zunächst eine deutliche Reduktion der Viabilität der Zellen sowohl nach Inhibitorbehandlung (Abb. 7) als auch nach siRNA-Transfektion (Appendix, Abb. A2) via MTT-Assay gezeigt werden. Darauffolgend konnte eine signifikante Induktion von DNA-Schäden durch den verwendeten VCP-Inhibitor CB5083 in beiden Zelllinien verzeichnet werden (Abb. 8). Als Folge dessen wurde Apoptose in beiden Zelllinien induziert (Abb. 9). Hierbei war auffällig, dass die Western Blots zur Apoptose-Analyse in HCT-116 Zellen eine stärkere Spaltung des Apoptosemarkers PARP nach siVCP1- und siVCP3-Transfektion aufweisen als nach CB5083-Behandlung. RKO Zellen hingegen weisen lediglich nach Inhibitorbehandlung eine deutliche Spaltung auf, die drei siRNAs gegen VCP hingegen führten kaum eine Spaltung von PARP herbei (Abb. 9A). Die Durchflusszytometer-Analyse zeigte einen Anstieg der nekrotischen Zellen vor allem 72h nach CB5083-induziertem VCP-Knockdown, im Gesamten waren es allerdings nicht viele nekrotische oder auch apoptotische Zellen (Abb. 9C). Somit scheint der zuvor beobachtete Rückgang der Viabilität zumindest zum Teil auf eine Induktion der Apoptose und Nekrose zurückzugehen. Diese Theorie wird durch die Literatur bestätigt. 2016 zeigte Bastola et al., dass die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit dem Vorläufer-Inhibitor von CB5083 DBeQ vermehrt zu früh- und spätapoptotischen Zellen, zur Spaltung von PARP und einer gesteigerten Caspase 3 Aktivität führt (Bastola et al. 2016). Außerdem zeigte eine andere Publikation aus dem gleichen Jahr, dass Nacktmäuse mit Tumoren aus HCT-116 Zellen nach CB5083-Behandlung erhöhte gespaltene PARP-Expression in den Tumorgewebeproben aufweisen (Anderson et al. 2015).

Um weiter zu klären, welche Auswirkungen die DNA-Schäden durch die VCP-Inhibition auf die Zellen hat und durch welchen Mechanismus die Inhibition der Zellviabilität vermittelt wird, wurden

Untersuchungen des Zellzyklus angestellt. Dabei zeigte sich zunächst im BrdU-Assay neben der zuvor ermittelten Inhibition der Viabilität via MTT auch eine signifikante Inhibition der Proliferation beider Zelllinien (Abb. 10). Weiter zeigte sich eine Heraufregulation verschiedener Zellzyklusinhibitoren wie *p15* und *p19* und eine Herunterregulierung einiger an der Zellzyklusprogression beteiligter Transkriptionsfaktoren wie *E2F1, E2F2* oder auch *E2F8*. Am deutlichsten und auffälligsten war allerdings die signifikant erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors p21 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 11 A und B). Bei einer weiteren Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte sich zunächst kein spezifischer Phasenarrest, sondern eine komplette Inhibition des Zellzyklus, was die Ergebnisse des BrdU-Assays und der erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren, erklärt.

In der Literatur wird vor allem ein G1-Arrest nach VCP-Inhibition beschrieben. Beispielsweise beschrieb Fu et al. in der zuvor bereits erwähnten Publikation, einen G1-Arrest nach lentiviraler shVCP-Tranfektion in HCT-116 Zellen, in RKO Zellen wurde nach VCP-Überexpression ein Rückgang der G1-Phase verzeichnet (Fu et al. 2016). Bastola et al. konnte ebenfalls einen G1-Arrest nach CB5083 und dessen Vorläuferinhibitor DBeQ Behandlung in Ovarialkarzinomzellen zeigen. Allerdings ist auch anzumerken, dass die Behandlung mit einem weiteren VCP-Inhibitor, ML-240, keine G1-Arrest erbrachte (Bastola et al. 2016).

In einer anderen Publikation aus 2020 konnte in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 gezeigt werden, dass VCP für die Degradation von p21 verantwortlich ist. Da p21, wie p27 auch, maßgeblich am Übergang der G1-Phase zur S-Phase beteiligt ist, folgern die Autoren dieser Publikation daraus, dass durch die Degradation von p21 auch der Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S- Phase gehemmt ist. Dies würde einen möglichen G1-Arrest erklären (Shi et al. 2020).

In dieser Arbeit konnte bei einer einfachen Zellzyklus-Analyse nur eine leichte Erhöhung der G1-Phase gezeigt werden (Abb. 12). Allerdings konnte eine erhöhte Expression von p21 und p27 via qPCR gezeigt werden, was der zuvor gestellten These zusagt und den leichten G1-Arrest erklären könnte. Da neben p21 und p27 aber auch die Inhibitoren der Cyclin-CDK-Komplexe erhöht exprimiert werden, wie p15 oder p19, erklärt dies die Inhibition bzw. die Verlangsamung des gesamten Zellzyklus.

Weiter wurde der zelluläre Mechanismus der Seneszenz untersucht. Der Vorgang der Seneszenz findet in allen Zellen physiologisch nach einer bestimmten Verdopplungszahl statt, führt zu einem Wachstumsarrest und wird dann zelluläre oder replikative Seneszenz genannt (Campisi 2005; Shay und Wright 2000). Phänotypisch zeigt sich dieser zelluläre Effekt in einer vergrößerten und abgeflachten Zellmorphologie, der Expression von vor allem p21 und p16 und auch erhöhter SA-β-Galaktosidase-Aktivität (Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007; Debacq-Chainiaux et al. 2009). Verschiedene Stressfaktoren wie oxidierende und DNA-schädigende Agentien und die Expression aktivierter Onkogene führen zu einer Induktion der SA-β-Galaktosidase (Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007; Chrétien et al. 2008; Collado et al. 2007). Im Gegensatz zu der permanent in allen Zellen induzierten lysosomalen β -Galaktosidase ist die SA- β -Galaktosidase nur bei einem pH Wert von 6,0 aktiv (Dimri et al. 1995).

In dieser Arbeit konnte eine eindeutige Induktion der Seneszenz nach CB5083-Behandlung sowohl in HCT-116 als auch RKO Zellen gezeigt werden (Abb. 14). Diese Ergebnisse passen zu der bereits gezeigten Wachstumsinhibition und der verstärkten p21-Expression. Einige Publikation stellten bereits die These auf, dass die Seneszenz einen potenten Tumorsuppressormechanismus darstellen könnte (Campisi 2005; Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007; Hinds und Pietruska 2017; Debacq-Chainiaux et al. 2009). Auch in diesem Fall wäre diese Theorie eine mögliche Erklärung. 2007 hat Sherman et al. publiziert, dass verschiedene Hitzeschockproteine, wie VCP, über die Aktivierung von Onkogenen, wie *Ras*, p53 stabilisieren und somit Seneszenz induzieren (Sherman et al. 2007) Auch in HeLa Zellen konnte bereits nach der Herunterregulierung von VCP eine Aktivierung von p53 und eine Induktion von p21, eines Zellzyklusarrests und eine morphologische Veränderung in Form von Vergrößerung, Abflachung und Vakuolisierung gezeigt werden, was alles für die Induktion der Seneszenz spricht (Wójcik et al. 2004).

Zusammen mit der erhöhten p21-Expression und der Wachstums- und Proliferationsinhibition zeigen diese Ergebnisse, dass VCP in den hier verwendeten kolorektalen Tumorzellen Seneszenz hemmt und dies möglicherweise einen Mechanismus darstellt, der in kolorektalen Tumoren für das Wachstum und die Progression verantwortlich sein könnte.

4.2. Autophagie-Induktion

Ein weiterer Punkt, der untersucht wurde, war die Induktion der Autophagie. Die Autophagie unterteilt sich in drei Unterarten: die Mikroautophagie, die Chaperonen-vermittelte Autophagie und die Makroautophagie. Dabei ist die Makroautophagie die am besten untersuchte Art (Glick et al. 2010).

Der Prozess der Makroautophagie, im Folgenden als Autophagie betitelt, beginnt mit der Bildung sogenannter Phagophoren als Ausstülpungen aus der Plasmamembran, dem ER, dem Golgi Apparat oder einem Mitochondrium (Glick et al. 2010). Diese Ausstülpung kapselt sich im Laufe der Autophagie ab und bildet das Autophagosom (Yang und Klionsky 2009). Dieses fusioniert im weiteren Verlauf mit dem Lysosom und bildet letztlich das Autolysosom. Der saure pH-Wert im Lumen des Lysosoms und die darin befindelichen Hydrolasen ermöglichen dann nach Fusion die Degradation der Zellorganellen etc. im Autolysosom. Vereinzelt werden Teile der degradierten Zellorganellen etc. zurück ins Cytoplasma zur Einschleusung in verschiedene biosynthetische Prozesse oder zur Energiegewinnung geschleust (Yorimitsu und Klionsky 2005).

Ein charakteristischer quantifizierbarer Marker für den Prozess der Autophagie ist die Sezernierung von LC3-II. Das *Microtubuli associated protein 1A/1B light chain 3*, kurz LC3, wird bei Initiierung der

Autophagie zunächst durch die Protease Atg4 aus der inaktiven Form pro-LC3 zu LC3-I sezerniert. An das C-terminale Glycin von LC3-I wird dann durch Atg3 und Atg7 Phosphatidylethanolamin konjugiert, wodurch der charakteristische Umschlag zu LC3-II stattfindet, der beispielsweise mittels Western Blot messbar ist (Runwal et al. 2019; Tanida et al. 2008).

Neben LC3-II stellt p62 ein Marker für die Autophagie dar. p62, auch Sequestosom1 genannt, ist ein Autophagierezeptor und führt ubiquitinierte Proteine zum Proteasom zur Degradation. Es bindet außerdem direkt an LC3-II. Während der Autophagie ist es allerdings selbst Substrat und wird daher im Laufe der Autophagie degradiert. (Liu et al. 2016; Bjørkøy et al. 2009). Somit stellen verminderte p62-Level einen weiteren Marker der Autophagie dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass es eventuell in HCT-116 zu einer leichten Induktion der Autophagie kam, was sich anhand der Erhöhung von LC3-II sagen lässt. Allerdings sind die p62-Level kaum verändert, was gegen eine bereits eingeläutete Autophagie spricht.

Möglicherweise kam es auch zu einer Unterbrechung bzw. Hemmung der Autophagie nach Einleitung. 2009 beschrieb Ju et al. eine Akkumulierung von Autophagosomen in IBMPFD (*Inclusion body myopathy (IBM) Paget's disease of the bone, and frontotemporal dementia*) Zellen mit mutiertem VCP. Durch die Mutationen in VCP ist dieses nicht mehr funktionsfähig, was die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen und damit die Reifung zu Autolysosomen inhibiert (Ju et al. 2009). Laut dieser Publikation wäre VCP essentiell für die Autophagie.

2015 zeigte Anderson et al. jedoch in Lungenkarzinomzellen, dass ein CB5083-induzierter VCP-Knockdown über mTOR Autophagie induziert, was sich in verminderten p62-Leveln zeigt (Anderson et al. 2015).

Diese beiden gegensätzlichen Ergebnisse machen deutlich, dass der Prozess der Autophagie sehr komplex ist und an verschiedenen Punkten inhibiert bzw. induziert werden kann. Ebenso scheint es Zelltyp abhängig zu sein, welche Rolle VCP bei der Autophagie spielt, wodurch eine Inhibition unterschiedliche Auswirkungen haben kann. Möglicherweise spielt auch der zeitliche Aspekt eine Rolle, wann der Knockdown von VCP stattfinden, ob die Autophagie schon initiiert wurde bzw. an welchem Punkt die Autophagie bereits ist. Letztendlich lässt sich sagen, dass VCP bei dem Prozess der Autophagie in Kolonkarzinomzellen beteiligt zu sein scheint, es gilt nun weitere Untersuchungen anzustellen, an welchem Punkt VCP welche Rolle spielt.

4.3. Ubiquitinierung

In jeder humanen Zelle finden pro Tag Zehntausende DNA-Läsionen und -Strangbrüche statt (Lindahl 1993). DNA-Doppelstrangbrüche sind die Folge von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren wie Replikationsstress, oxidativer Stress oder auch Strahlung und verschiedene Chemikalien (Torrecilla et al. 2017; Lindahl 1993). Werden diese DNA-Schäden nicht repariert, kann das zu genomischer Instabilität, Mutationen und auch zum Zelltod führen (Torrecilla et al. 2017). Bei der Reparatur dieser Schäden spielt VCP eine Rolle.

Kommt es zu Doppelstrangbrüchen, werden zunächst verschiedene Lysinreste am Doppelstrangbruch durch verschiedene Klassen von Ubiquitinligasen mono- und polyubiquitiniert (Meyer und Weihl 2014). Diese Polyubiquitinkette fungiert dann als Signal für den proteasomalen Abbau, DNA-Reparatur oder auch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, abhängig vom ubiquitinierten Lysinrest (Weissman 2001).

VCP hat hier verschiedene Funktionen. Einerseits spielt VCP bei der proteasomalen Degradation von polyubiquitinierten Proteinen eine Rolle. Es bindet entweder direkt oder auch indirekt an ubiquitinierte Substrate und extrahiert diese von Membranen oder zellulären Organellen. Außerdem kann es mit seiner Segregasefunktion polyubiquitinierte Proteine von seinen Bindungspartnern trennen und sie so zum Proteasom überführen (Meyer und Weihl 2014).

Andererseits werden auch monoubiquitinierte Substrate oder nicht-degradative Ubiquitinketten von VCP erkannt und dienen als Signale zur Induktion von Signalkaskaden oder auch der DNA-Schadensantwort (Meyer und Weihl 2014).

2011 publizierten Meerang et. al. zwei mögliche Funktionen von VCP im Ubiquitinsystem. Dabei wird VCP zunächst durch den Adaptorheterodimer UFD1-NPL4 zum ubiquitinierten Lysinrest 48 rekrutiert, wo es einerseits als Ausgangspunkt zur Rekrutierung verschiedener Ubiquitinligasen oder Deubiquitinierungsenzyme fungiert. Anderseits kann VCP unter ATP-Hydrolyse Ubiquitinketten entfernen, um so Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktion zu ermöglichen, was einen essentiellen Schritt für die DNA-Schadensantwort darstellt (Meerang et al. 2011).

Wie der Western Blot zeigte, führt eine Inhibition von VCP in CRC-Zellen zu stark vermehrter Ubiquitinierung (Abb. 16).

Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Szczęśniak et al. Dabei induzierte CB5083 in AML-Zellen bereits nach 16 Stunden eine deutlich stärkere Ubiquitinierung im Western Blot verglichen mit der unbehandelten bzw. DMSO-Kontrolle.

Diese Ergebnisse und die Ergebnisse dieser Arbeit passen somit zu der zuvor genannten Funktion von VCP Ubiquitinketten für Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktion zu entfernen. In kolorektalen Karzinomzellen scheint VCP also für die Deubiquitinierung von Proteinen verantwortlich zu sein. Dies könnte einerseits der Verhinderung von Degradation dienen, andererseits könnte die Deubiquitinierung bei VCP-Überexpression auch die DNA-Schadensantwort und Reparatur initiieren und ermöglichen. Diese These würde zu der zuvor beobachteten Vermehrung der DNA-Schäden nach VCP-Inhibition passen. So würde eine VCP-Überexpression in kolorektalen Karzinomzellen zu vermehrter

Deubiquitinierung und daraus resultierend zu vermehrter DNA-Reparatur führen, was letztlich die DNA-Schäden minimieren würde und die Viabilität der Zellen und die Progression von Kolonkarzinomen ermöglichen würde.

4.4. <u>Unfolded Protein Response</u>

Durch die zellulären Funktionen von VCP und die Aktivierung des UPS werden verschiedene weitere zelluläre Funktionen wie Autophagie, Apoptose und auch die ERAD getriggert (Abb. 3). Wie bereits vorherige Ergebnisse zeigten, induziert eine VCP-Inhibition Apoptose und Nekrose, einen Zellzyklusarrest und eine Proliferationsinhibition, minimal die Autophagie und auch eindeutig Ubiquitinierung. Alle diese Effekte könnten eine Folge der Initiierung des UPS sein.

Alle drei UPS-Signalwege werden durch ER-Stress aktiviert. Das wird im ersten Signalweg vom Stresssensor IRE1 α , *Inositol-requiring protein 1\alpha*, wahrgenommen. Als Folge davon kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung von IRE1 α . Daraufhin wird die RNase-Aktivität des Sensors aktiviert, die dann die ungespleißte XBP1-mRNA (XBP1u) zu einem aktiven Transkriptionsfaktor XBP1s spleißt, der dann die Transkription von Zielgenen für ERAD, die Phospholipidsynthese und die Proteinqualitätskontrolle ermöglicht.

In der zweiten Signalkaskade löst ER-Stress ebenfalls eine Dimerisierung und Autophosphorylierung von PERK aus. Der damit aktivierte Stresssensor phosphoryliert anschließend eIF2 α , den *eukaryotic translation initiator factor 2\alpha*, was eine Translation des Transkriptionsfaktors ATF4 ermöglicht. Zielgene, die durch ATF transkribiert werden, sind bei der Autophagie, Apoptose und dem Aminosäuren Metabolismus beteiligt.

Im letzten Signalweg führt ER-Stress zu einer Translokation von ATF6 aus der ER-Membran in den Golgi Apparat mithilfe des *Coat Protein II*, COPII. Im Golgi Apparat wird ATF durch Site 1 und Site 2 Proteasen (S1P, S2P) geschnitten und das cytosolische Domäne-Fragment (ATF6f) entlassen. ATF6f dient als Transkriptionsfaktor für Gene der ERAD und auch für XBP1 (Hetz 2012).



Abbildung 18: schematische Darstellung aller drei Wege des Unfolded Protein Systems. Nach (Hetz 2012), erstellt durch BioRender.com

Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten eine Induktion des zweiten und dritten Arms der UPR auf RNA-Ebene. Auffällig war hier allerdings, dass der Effekt für HCT-116 Zellen deutlicher ausfiel als für RKO Zellen. In den RKO Zellen wurde die UPR vor allem durch die siRNA-Transfektion verursacht und nur sehr geringfügig durch den Inhibitor. Auf Proteinebene war lediglich für siRNA-transfizierte HCT-116 Zellen eine erhöhte ATF4-Expression darstellbar. Das Spaltprodukt von ATF6 war nur sehr schwach nachweisbar und nicht konstant, was die teilweise sehr große Standardabweichung erklärt. Es scheint also durch eine Inhibition von VCP zu einer Induktion der UPR zu kommen, allerdings teilweise nur schwach und unbeständig.

In AML-Zelllinien konnte bereits durch den VCP-Inhibitor CB5083 gezeigt werden, dass es zu einer Überexpression von PERK, IRE1α und dem Chaperon BiP kommt (Szczęśniak et al. 2022). Noch deutlicher zeigte es Li et al. Hier konnte in Mammakarzinom Zelllinien sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine zeit- und dosisabhängige Induktion der UPR nach VCP-Inhibitor Eeyarestatin1- und NMS873-Behandlung gezeigt werden. Auffällig war hier allerdings, dass *CHOP*, das Zielgen des zweiten UPR-Weges, nur nach sehr hohen Inhibitordosen nachgewiesen werden konnte (Li et al. 2021).

Ein Review aus dem Jahr 2021 fasst die Rolle der UPR in Krebszellen gut zusammen. Dabei wird die UPR grundsätzlich als "zweischneidiges Schwert" beschrieben (Huang et al. 2021). Einerseits wird beschrieben, dass eine Inhibition der UPR zu einer Verlangsamung der Progression und Metastasierung führt (Lee et al. 2014). Eine Aktivierung von IRE1α kann beispielsweise die Expression von XBP1s fördern und dadurch ERAD und damit Überleben von Zellen ermöglichen (Maurel et al. 2015).

Außerdem können Krebszellen durch Übertragung von ER-Stress auf Immunzellen diese so modulieren, dass ein Überleben der Krebszellen selbst ermöglicht wird (Mahadevan et al. 2012). Auch unter Hypoxie oder Nährstoffmangel kann PERK das Überleben von Krebszellen verlängern (Ranganathan et al. 2006). PERK führt daneben über die Induktion der Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu vermehrter Vaskularisierung und Angiogenese (Macarulla et al. 2020). Allerdings führt CHOP, die Zielstruktur des PERK-Weges, auch über die Bildung von sogenannten *reactive oxygen species* (ROS) zu andauerndem ER-Stress und damit zum Zelltod. Grundsätzlich kann CHOP zur Aktivierung proapoptotischer und Hemmung antiapoptotischer Faktoren führen (Puthalakath et al. 2007; McCullough et al. 2001).

In Kolonkarzinomen speziell spielt beispielsweise das zur Heat shock protein 70 Familie gehörende Chaperon BiP eine Rolle. Dabei kann es einerseits die Entwicklung in frühen Stadien durch die Induktion eines Ruhezustandes hemmen, andererseits kann es in bereits fortgeschrittenen Stadien das Überleben, die Progression und die Metastasierung fördern (Arap et al. 2004; Dong et al. 2008; Dong et al. 2011).

Für den IRE1α-Weg konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass es durch Rekrutierung des Adaptorproteins TRAF2 und dessen Interaktion mit JNK zu einer Caspase 12-Aktivierung und somit zur Apoptose kommt (Yoneda et al. 2001). Außerdem scheint IRE1α essentiell für die Angiogenese in kolorektalen Karzinomzellen zu sein. Eine Überexpression des *downstream* Zielgens von IRE1α *XBP1* fördert die Invasion der Krebszellen, wohingegen ein siRNA-vermittelter Knockdown von *XBP1* den VEGF Rezeptor-2 und damit die Angiogenese hemmt (Mhaidat et al. 2015).

Das zeigt wie ambivalent eine Aktivierung der UPR wirken kann. Im Rahmen dieser Arbeit kam es nach *VCP*-Knockdown auf RNA-Ebene zu einer Aktvierung des PERK- und des ATF6-Weges. Möglicherweise ist die zuvor beobachtete Viabilitäts- und Proliferationshemmung auf diese UPR-Aktivierung zurückzuführen. Um dies zu bestätigen, müsste man allerdings noch weitere genauere Analysen anstellen und weitere funktionelle Assays durchführen.

Aus den hier gewonnenen Ergebnissen kristallisiert sich *VCP* als gutes potentielles Zielgen für therapeutische Ansätze und Studien heraus. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von VCP im kolorektalen Zellkulturmodell zu einer deutlichen Inhibition der Zellviabilität und Proliferation führt. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Induktion von DNA-Schäden und die daraus resultierende vermehrte Ubiquitinierung und die Induktion von Apoptose, Nekrose oder möglicherweise auch Nekroptose, eines Zellzyklusarrests und der Induktion der UPR und Seneszenz zurückzuführen. Diese neuen Daten könnten als Grundlage neuer Forschungsansätze fungieren und das Fundament für weiterführende Untersuchungen im Kontext neuer Therapiemöglichkeiten für Kolonkarzinome bilden.

4.5. Ausblick

In dieser Arbeit kristallisierte sich VCP als potentieller prognostischer Marker und therapeutische Zielstruktur heraus und könnte einen neuen therapeutischen Weg darstellen. Allerdings sollten hierfür die hier gewonnenen und beschriebenen Ergebnisse vertieft werden. Dabei müssen einerseits die *in vitro* durchgeführten Versuche natürlich in einem Tierversuchsmodell *in vivo* überprüft werden. Anderseits könnten aber auch die einzelnen Effekte, die beobachtet wurden, näher untersucht und deren Grundlage analysiert werden. Beispielsweise stellt die Untersuchung von Signalwegen einen wichtigen Aspekt dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass VCP in Osteosarkomzellen Metastasierung über den NFkB Signalweg fördert (Asai et al. 2002). Dabei degradiert VCP den NFkB-Inhibitor IkBa, wodurch es zur erhöhten Expression von Genen kommt, die Zellwachstum fördern und Apoptose inhibieren. Dieser Effekt konnte auch bereits *in vivo* für IBMPFD gezeigt werden (Custer et al. 2010). In kolorektalen Karzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitin-specific protease (USP11) in Abhängigkeit von VCP Autophagie über den mTOR-Signalweg reguliert (Sun et al. 2021). Daher wären weitere Untersuchungen ein interessanter weiterer Weg, um genauere Einblicke und Erkenntnisse über die Funktionsweise von VCP in kolorektalen Karzinomzellen gewinnen zu können und damit neuen Therapieansätzen näher zu kommen.

5. Zusammenfassung

Kolonkarzinome sind weltweit die dritthäufigste und zweittödlichste Krebserkrankung. Dabei sind Menschen, die sich nur geringfügig körperlich betätigen, viel Salz und rotes Fleisch konsumieren, aktiv oder passiv rauchen, übergewichtig oder familiär prädispositioniert sind, besonders gefährdet für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms. Diese Entwicklung dauert meist mehrere Jahre und setzt verschiedene Mutationen und Verluste von Genen voraus, die aus einem Polypen ein metastasierendes und invasives Karzinom werden lassen. Die Statistik und die Prognose von etwa 3,2 Millionen neuer CRC Fälle für das Jahr 2040 machen die Dringlichkeit neuer Therapie- und Diagnosemöglichkeiten deutlich.

Ein shRNA Library Screening in Pankreaskarzinom-Zelllinien brachte *VCP* als potentielles Zielgen für zielgerichtete Therapiemöglichkeiten hervor. VCP, das *valosine-containing protein*, ist ein Chaperon, das an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist. Beispielsweise ist es essentiell für die proteasomale Degradation fehl- oder ungefalteter Proteine und spielt auch bei der Ubiquitinierung eine Rolle. Wie bereits einige Publikationen zeigen konnten, ist VCP in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert und geht mit einer schlechteren Prognose einher. In Gewebeproben von Kolonkarzinom Patienten konnten Analysen der Datenbanken TGAC und GTEx ebenfalls eine VCP-Überexpression zeigen. Welche Rolle das überexprimierte VCP in kolorektalen Krebszellen spielt und wie es Viabilität, Proliferation und Progression von Kolonkarzinomen beeinflusst, ist allerdings noch unklar. Daher stellen weitere Untersuchungen zu der zellulären Funktion von VCP in kolorektalen Krebszellen einen interessanten Ausgangspunkt dar.

Ziel dieser Arbeit war es die zellulären Effekte einer Herunterregulierung von VCP in verschiedenen Prozessen zu analysieren, um so erste Aussagen über die Funktion von VCP im Kolonkarzinom, über die Wirkung der Überexpression von VCP im Kolonkarzinom und über VCP als potentieller Bio-, Diagnose- und Prognosemarker im Kolonkarzinom treffen zu können.

Hierfür wurden zunächst Viabilitäts- und Proliferationsanalysen durchgeführt, die zeigen konnten, dass ein VCP-Knockdown sowohl Viabilität als auch Proliferation signifikant hemmt. Weiter konnte gezeigt werden, dass es durch einen Knockdown von VCP zu einer Induktion von DNA-Schäden, der Apoptose, eines Zellzyklusarrest und partiell der UPR kommt. Außerdem scheint VCP an der Deubiquitinierung von Proteinen beteiligt zu sein. Eine Induktion der Autophagie konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Diese Daten eröffnen einen neuen, bisher unklaren Blickwinkel auf potentielle Therapiemöglichkeiten und VCP als Prognosemarker im kolorektalen Karzinom. Es wurde gezeigt, dass VCP an diversen zellulären Prozessen beteiligt ist und maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Viabilität und Proliferation beiträgt. Alles in allem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass VCP auch im Kolonkarzinom als
prognostischer und therapeutischer Biomarker fungieren könnte und diese Daten als vielversprechende Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen könnten.

6. <u>Summary</u>

Colorectal cancer is the third most common and second most lethal cancer worldwide. Risk factors for developing CRC are low physical activity, high consumption of red meat and salt, smoking, adiposity and familiar predisposition. The development from a small polyp to an invasive metastatic carcinoma takes years and presumes losses and mutations of various genes. The prognosis of about 3,2 million new diagnosed CRC cases in 2040 reveals the urgency for new therapy and diagnostic possibilities.

In a previous project a shRNA library screening in pancreatic cancer cell lines identified *VCP* as a potential new target for targeted therapies. VCP, the valosine-containing protein, is a chaperon, which takes part in different cellular processes, e.g. the proteasomal degradation of mis- and unfolded proteins or ubiquitination. A few publications already showed an overexpression of VCP in various tumor entities. This overexpression was shown to correlate with a poor prognosis. Databank analysis of CRC patient tissue samples also revealed VCP overexpression. The role of this overexpression in CRC and how it affects its viability, proliferation and progression remains unclear. Therefore, further analysis about the cellular functions of VCP in CRC represent an interesting starting point.

The aim of this dissertation was to determine the cellular effects of a VCP knockdown on various processes. On the basis of this, statements should be made about the functions of VCP in CRC, about the effect of a VCP overexpression in CRC and if VCP could also serve as a diagnostic and prognostic biomarker in CRC cells.

For this, viability and proliferation assays were performed. This showed that VCP seems to be essential for and CRC cell viability and proliferation. Further, it could be demonstrated that a VCP knockdown also seems to induce DNA damage, apoptosis, cell cycle arrest, senescence and partly UPR. An induction of autophagy could not be shown.

These data reveal a new, until now unclear perspective on potential new therapy approaches and VCP as prognostic marker in CRC. It was shown that VCP takes part in various cellular processes and that VCP is significantly involved in the maintenance of viability and proliferation of CRC cells. In conclusion, these results could be a first evidence for VCP as therapeutic and prognostic biomarker and could also be a promising basis for further analysis.

Literaturverzeichnis

- Amado, Rafael G.; Wolf, Michael; Peeters, Marc; van Cutsem, Eric; Siena, Salvatore; Freeman, Daniel J. et al. (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (10), S. 1626–1634. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.7116.
- Anderson, Daniel J.; Le Moigne, Ronan; Djakovic, Stevan; Kumar, Brajesh; Rice, Julie; Wong, Steve et al. (2015): Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. In: *Cancer cell* 28 (5), S. 653–665. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.002.
- Arap, Marco A.; Lahdenranta, Johanna; Mintz, Paul J.; Hajitou, Amin; Sarkis, Alvaro S.; Arap, Wadih; Pasqualini, Renata (2004): Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. In: *Cancer cell* 6 (3), S. 275–284. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.08.018.
- Asai, Tatsuya; Tomita, Yasuhiko; Nakatsuka, Shin-ichi; Hoshida, Yoshihiko; Myoui, Akira; Yoshikawa, Hideki; Aozasa, Katsuyuki (2002): VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. In: *Japanese journal of cancer research : Gann* 93 (3), S. 296–304. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb02172.x.
- Bastola, Prabhakar; Neums, Lisa; Schoenen, Frank J.; Chien, Jeremy (2016): VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal. In: *Molecular oncology* 10 (10), S. 1559–1574. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.09.005.
- Basu, Ashis K. (2018): DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. In: International journal of molecular sciences 19 (4). DOI: 10.3390/ijms19040970.
- Berardo, Clarissa; Siciliano, Veronica; Di Pasqua, Laura G.; Richelmi, Plinio; Vairetti, Mariapia; Ferrigno, Andrea (2019): Comparison between Lipofectamine RNAiMAX and GenMute transfection agents in two cellular models of human hepatoma. In: *European journal of histochemistry : EJH* 63 (3). DOI: 10.4081/ejh.2019.3048.
- Bertram, John S. (2000): The molecular biology of cancer. In: *Molecular Aspects of Medicine* 21 (6), S. 167–223. DOI: 10.1016/S0098-2997(00)00007-8.
- Bjørkøy, Geir; Lamark, Trond; Pankiv, Serhiy; Øvervatn, Aud; Brech, Andreas; Johansen, Terje (2009):
 Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In: Autophagy in mammalian systems, Bd. 452. Amsterdam, Heidelberg: Elsevier (Methods in Enzymology, 452), S. 181–197.
- Bradford, Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Campisi, Judith (2005): Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. In: *Cell* 120 (4), S. 513–522. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.003.

- Campisi, Judith; Di d'Adda Fagagna, Fabrizio (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (9), S. 729–740. DOI: 10.1038/nrm2233.
- Carrington, Emma V.; Scott, S. Mark (2014): Physiology and function of the colon. In: Miranda Lomer (Hg.): Advanced nutrition and dietetics in gastroenterology. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell (Advanced nutrition and dietetics book series), S. 28–32.
- Centers for Disease Control and Prevention (2022a): An Update on Cancer Deaths in the United States. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/cancer/dcpc/research/update-on-cancerdeaths/index.htm, zuletzt aktualisiert am 08.08.2022, zuletzt geprüft am 08.08.2022.
- Centers for Disease Control and Prevention (2022b): Colorectal (Colon) Cancer | CDC. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/, zuletzt aktualisiert am 18.08.2022, zuletzt geprüft am 18.08.2022.
- Centers for Disease Control and Prevention (2022c): What Are the Symptoms of Colorectal Cancer? | CDC. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/symptoms.htm, zuletzt aktualisiert am 18.08.2022, zuletzt geprüft am 18.08.2022.
- Chan, Chia-Hsin; Ko, Chia-Cheng; Chang, Jan-Gowth; Chen, Sung-Fang; Wu, Ming-Shiang; Lin, Jaw-Town; Chow, Lu-Ping (2006): Subcellular and functional proteomic analysis of the cellular responses induced by Helicobacter pylori. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5 (4), S. 702–713. DOI: 10.1074/mcp.M500029-MCP200.
- Chrétien, Aline; Dierick, Jean-François; Delaive, Edouard; Larsen, Martin Røssel; Dieu, Marc; Raes, Martine et al. (2008): Role of TGF-beta1-independent changes in protein neosynthesis, p38alphaMAPK, and cdc42 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis. In: *Free radical biology & medicine* 44 (9), S. 1732–1751. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.026.
- Collado, Manuel; Blasco, Maria A.; Serrano, Manuel (2007): Cellular senescence in cancer and aging. In: *Cell* 130 (2), S. 223–233. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.003.
- Conlin, A.; Smith, G.; Carey, F. A.; Wolf, C. R.; Steele, R. J. C. (2005): The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. In: *Gut* 54 (9), S. 1283–1286. DOI: 10.1136/gut.2005.066514.
- Costantini, Susan; Capone, Francesca; Polo, Andrea; Bagnara, Palmina; Budillon, Alfredo (2021): Valosin-Containing Protein (VCP)/p97: A Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 22 (18). DOI: 10.3390/ijms221810177.
- Custer, Sara K.; Neumann, Manuela; Lu, Hongbo; Wright, Alexander C.; Taylor, J. Paul (2010): Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. In: *Human molecular genetics* 19 (9), S. 1741– 1755. DOI: 10.1093/hmg/ddq050.
- Debacq-Chainiaux, Florence; Erusalimsky, Jorge D.; Campisi, Judith; Toussaint, Olivier (2009): Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker

of senescent cells in culture and in vivo. In: *Nat Protoc* 4 (12), S. 1798–1806. DOI: 10.1038/nprot.2009.191.

- DeLaBarre, Byron; Brunger, Axel T. (2003): Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. In: *Nature structural biology* 10 (10), S. 856–863. DOI: 10.1038/nsb972.
- Deutsche Krebsgesellschaft: Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, zuletzt geprüft am 23.08.2022.
- Di Xia; Tang, Wai Kwan; Ye, Yihong (2016): Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. In: *Gene* 583 (1), S. 64–77. DOI: 10.1016/j.gene.2016.02.042.
- Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C. et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20), S. 9363–9367. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- Dong, Dezheng; Ni, Min; Li, Jianze; Xiong, Shigang; Ye, Wei; Virrey, Jenilyn J. et al. (2008): Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. In: *Cancer research* 68 (2), S. 498–505. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2950.
- Dong, Dezheng; Stapleton, Christopher; Luo, Biquan; Xiong, Shigang; Ye, Wei; Zhang, Yi et al. (2011): A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. In: *Cancer research* 71 (8), S. 2848–2857. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3151.
- Erdmann, Friederike; Spix, Claudia; Katalinic, Alexander; Christ, Monika; Folkerts, Juliane; Hansmann, Jutta et al. (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.
- Fearon, Eric R.; Vogelstein, Bert (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell* 61 (5),
 S. 759–767. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
- Fu, Qianfeng; Jiang, Yuling; Zhang, Daxin; Liu, Xiuli; Guo, Junfeng; Zhao, Jinlong (2016): Valosincontaining protein (VCP) promotes the growth, invasion, and metastasis of colorectal cancer through activation of STAT3 signaling. In: *Molecular and cellular biochemistry* 418 (1-2), S. 189–198. DOI: 10.1007/s11010-016-2746-6.
- Ghasemi, Mahshid; Turnbull, Tyron; Sebastian, Sonia; Kempson, Ivan (2021): The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. In: *International journal of molecular sciences* 22 (23). DOI: 10.3390/ijms222312827.
- Glick, Danielle; Barth, Sandra; Macleod, Kay F. (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. In: *The Journal of pathology* 221 (1), S. 3–12. DOI: 10.1002/path.2697.

- Guo, Xing; Sun, XiaoYan; Di Hu; Wang, Ya-Juan; Fujioka, Hisashi; Vyas, Rajan et al. (2016): VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. In: *Nature communications* 7, S. 12646. DOI: 10.1038/ncomms12646.
- Hetz, Claudio (2012): The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nrm3270.
- Hinds, Philip; Pietruska, Jodie (2017): Senescence and tumor suppression. In: *F1000Research* 6, S. 2121. DOI: 10.12688/f1000research.11671.1.
- Huang, Jingjing; Pan, Huayang; Wang, Jinge; Wang, Tong; Huo, Xiaoyan; Ma, Yong et al. (2021):
 Unfolded protein response in colorectal cancer. In: *Cell & bioscience* 11 (1), S. 26. DOI: 10.1186/s13578-021-00538-z.
- Jen, J.; Kim, H.; Piantadosi, S.; Liu, Z. F.; Levitt, R. C.; Sistonen, P. et al. (1994): Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 331 (4), S. 213–221. DOI: 10.1056/NEJM199407283310401.
- Johnson, Constance M.; Wei, Caimiao; Ensor, Joe E.; Smolenski, Derek J.; Amos, Christopher I.; Levin, Bernard; Berry, Donald A. (2013): Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. In: *Cancer causes & control : CCC* 24 (6), S. 1207–1222. DOI: 10.1007/s10552-013-0201-5.
- Johnson, Janel O.; Mandrioli, Jessica; Benatar, Michael; Abramzon, Yevgeniya; van Deerlin, Vivianna M.; Trojanowski, John Q. et al. (2010): Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. In: *Neuron* 68 (5), S. 857–864. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.036.
- Ju, Jeong-Sun; Fuentealba, Rodrigo A.; Miller, Sara E.; Jackson, Erin; Piwnica-Worms, David; Baloh, Robert H.; Weihl, Conrad C. (2009): Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. In: *The Journal of Cell Biology* 187 (6), S. 875–888. DOI: 10.1083/jcb.200908115.
- Karlen, Yann; McNair, Alan; Perseguers, Sébastien; Mazza, Christian; Mermod, Nicolas (2007): Statistical significance of quantitative PCR. In: *BMC bioinformatics* 8, S. 131. DOI: 10.1186/1471-2105-8-131.
- Kay, Jennifer; Thadhani, Elina; Samson, Leona; Engelward, Bevin (2019): Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. In: *DNA repair* 83, S. 102673. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102673.
- Kralik, Petr; Ricchi, Matteo (2017): A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 108. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00108.
- Laguë, Marie-Noëlle; Romieu-Mourez, Raphaëlle; Bonneil, Éric; Boyer, Alexandre; Pouletty, Nicolas; Mes-Masson, Anne-Marie et al. (2012): Proteomic profiling of a mouse model for ovarian granulosa cell tumor identifies VCP as a highly sensitive serum tumor marker in several human cancers. In: *PloS one* 7 (8), e42470. DOI: 10.1371/journal.pone.0042470.

- Lee, Bo-Ra; Chang, Sun-Young; Hong, Eun-Hye; Kwon, Bo-Eun; Kim, Hong Min; Kim, Yeon-Jeong et al. (2014): Elevated endoplasmic reticulum stress reinforced immunosuppression in the tumor microenvironment via myeloid-derived suppressor cells. In: *Oncotarget* 5 (23), S. 12331–12345. DOI: 10.18632/oncotarget.2589.
- Lewandowska, Anna; Rudzki, Grzegorz; Lewandowski, Tomasz; Stryjkowska-Góra, Aleksandra; Rudzki, Sławomir (2022): Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. In: *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 29, 10732748211056692. DOI: 10.1177/10732748211056692.
- Li, Chuang; Huang, Yongsheng; Fan, Qianqian; Quan, Hongyang; Dong, Yeqing; Nie, Meng et al. (2021): p97/VCP is highly expressed in the stem-like cells of breast cancer and controls cancer stemness partly through the unfolded protein response. In: *Cell death & disease* 12 (4), S. 286. DOI: 10.1038/s41419-021-03555-5.
- Lièvre, Astrid; Bachet, Jean-Baptiste; Boige, Valérie; Cayre, Anne; Le Corre, Delphine; Buc, Emmanuel et al. (2008): KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (3), S. 374–379. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.5906.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. In: *Nature* 362 (6422), S. 709–715. DOI: 10.1038/362709a0.
- Liu, Ting; Zhu, Wei; Yang, Xiang; Chen, Lin; Yang, Rongwu; Hua, Zichun; Li, Genxi (2009): Detection of apoptosis based on the interaction between annexin V and phosphatidylserine. In: *Analytical chemistry* 81 (6), S. 2410–2413. DOI: 10.1021/ac801267s.
- Liu, Wei Jing; Ye, Lin; Huang, Wei Fang; Guo, Lin Jie; Xu, Zi Gan; Wu, Hong Luan et al. (2016): p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. In: *Cell Mol Biol Lett* 21 (1), S. 1–14. DOI: 10.1186/s11658-016-0031-z.
- Longo, Patti A.; Kavran, Jennifer M.; Kim, Min-Sung; Leahy, Daniel J. (2013): Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). In: *Methods in enzymology* 529, S. 227–240. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.
- Macarulla, Teresa; Montagut, Clara; Sánchez-Martin, Francisco Javier; Granja, Mónica; Verdaguer, Helena; Sastre, Javier; Tabernero, Josep (2020): The role of PIGF blockade in the treatment of colorectal cancer: overcoming the pitfalls. In: *Expert opinion on biological therapy* 20 (1), S. 15–22. DOI: 10.1080/14712598.2020.1677603.
- Mah, L-J; El-Osta, A.; Karagiannis, T. C. (2010): gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. In: *Leukemia* 24 (4), S. 679–686. DOI: 10.1038/leu.2010.6.
- Mahadevan, Navin R.; Anufreichik, Veronika; Rodvold, Jeffrey J.; Chiu, Kevin T.; Sepulveda, Homero; Zanetti, Maurizio (2012): Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells

and impair CD8⁺ T cell priming. In: *PloS one* 7 (12), e51845. DOI: 10.1371/journal.pone.0051845.

- Manohar, Sonal M.; Shah, Prachi; Nair, Anusree (2021): Flow cytometry: principles, applications and recent advances. In: *Bioanalysis* 13 (3), S. 181–198. DOI: 10.4155/bio-2020-0267.
- Maurel, Marion; McGrath, Eoghan P.; Mnich, Katarzyna; Healy, Sandra; Chevet, Eric; Samali, Afshin (2015): Controlling the unfolded protein response-mediated life and death decisions in cancer. In: *Seminars in cancer biology* 33, S. 57–66. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.03.003.
- McCullough, K. D.; Martindale, J. L.; Klotz, L. O.; Aw, T. Y.; Holbrook, N. J. (2001): Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. In: *Molecular and cellular biology* 21 (4), S. 1249–1259. DOI: 10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001.
- Meerang, Mayura; Ritz, Danilo; Paliwal, Shreya; Garajova, Zuzana; Bosshard, Matthias; Mailand, Niels et al. (2011): The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. In: *Nature cell biology* 13 (11), S. 1376–1382. DOI: 10.1038/ncb2367.
- Meyer, Hemmo; Bug, Monika; Bremer, Sebastian (2012): Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. In: *Nature cell biology* 14 (2), S. 117–123. DOI: 10.1038/ncb2407.
- Meyer, Hemmo; Weihl, Conrad C. (2014): The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 18), S. 3877–3883. DOI: 10.1242/jcs.093831.
- Mhaidat, Nizar M.; Alzoubi, Karem H.; Abushbak, Ayed (2015): X-box binding protein 1 (XBP-1) enhances colorectal cancer cell invasion. In: *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 27 (3), S. 167–173. DOI: 10.1179/1973947815Y.0000000006.
- Mitchell, J. (2003): RT-PCR Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 193: O'Connell J, ed. (\$99.50.) Humana Press, 2002. ISBN 0 89603 875 0. In: *Journal of Clinical Pathology* 56 (5), S. 400.
- Moir, D.; Stewart, S. E.; Osmond, B. C.; Botstein, D. (1982): Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. In: *Genetics* 100 (4), S. 547–563. DOI: 10.1093/genetics/100.4.547.
- National Cancer Institute (2022): Risk Factors: Age. Online verfügbar unter https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age, zuletzt aktualisiert am 12.08.2022, zuletzt geprüft am 12.08.2022.
- Nguyen, Ha Thi; Duong, Hong-Quan (2018): The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. In: *Oncology letters* 16 (1), S. 9–18. DOI: 10.3892/ol.2018.8679.
- Noubissi, Felicite K.; McBride, Amber A.; Leppert, Hannah G.; Millet, Larry J.; Wang, Xiaofei; Davern, Sandra M. (2021): Detection and quantification of γ-H2AX using a dissociation enhanced

lanthanide fluorescence immunoassay. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 8945. DOI: 10.1038/s41598-021-88296-3.

- Pappou, Emmanouil P.; Ahuja, Nita (2010): The role of oncogenes in gastrointestinal cancer. In: *Gastrointestinal Cancer Research : GCR* (Suppl 1), S2-S15.
- Phipps, A. I.; Buchanan, D. D.; Makar, K. W.; Win, A. K.; Baron, J. A.; Lindor, N. M. et al. (2013): KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. In: *British Journal of Cancer* 108 (8), S. 1757–1764. DOI: 10.1038/bjc.2013.118.
- Puthalakath, Hamsa; O'Reilly, Lorraine A.; Gunn, Priscilla; Lee, Lily; Kelly, Priscilla N.; Huntington, Nicholas D. et al. (2007): ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. In: *Cell* 129 (7), S. 1337–1349. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.027.
- Ranganathan, Aparna C.; Adam, Alejandro P.; Zhang, Lin; Aguirre-Ghiso, Julio A. (2006): Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? In: *Cancer biology & therapy* 5 (7), S. 729–735. DOI: 10.4161/cbt.5.7.2968.
- Reutelingsperger, C. P.; van Heerde, W. L. (1997): Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. In: *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* 53 (6), S. 527–532. DOI: 10.1007/s000180050067.
- Riccardi, Carlo; Nicoletti, Ildo (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. In: *Nature protocols* 1 (3), S. 1458–1461. DOI: 10.1038/nprot.2006.238.
- Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5858–5868. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Runwal, Gautam; Stamatakou, Eleanna; Siddiqi, Farah H.; Puri, Claudia; Zhu, Ye; Rubinsztein, David
 C. (2019): LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. In: *Sci Rep* 9 (1),
 S. 10147. DOI: 10.1038/s41598-019-46657-z.
- Sawicki, Tomasz; Ruszkowska, Monika; Danielewicz, Anna; Niedźwiedzka, Ewa; Arłukowicz, Tomasz; Przybyłowicz, Katarzyna E. (2021): A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. In: *Cancers* 13 (9). DOI: 10.3390/cancers13092025.
- Schimanski, Sven (2021): Funktionelle Charakterisierung der zellulären Rolle des Kandidatengens Valosin containing protein im Pankreaskarzinom. Unter Mitarbeit von Medizin und Malte Buchholz.
- Shay, J. W.; Wright, W. E. (2000): Hayflick, his limit, and cellular ageing. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (1), S. 72–76. DOI: 10.1038/35036093.
- Sherman, Michael Y.; Gabai, Vladimir; O'Callaghan, Cornelia; Yaglom, Julia (2007): Molecular chaperones regulate p53 and suppress senescence programs. In: *FEBS letters* 581 (19), S. 3711– 3715. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.036.

- Shi, Xianli; Zhu, Kaiyuan; Ye, Zuodong; Yue, Jianbo (2020): VCP/p97 targets the nuclear export and degradation of p27Kip1 during G1 to S phase transition. In: *FASEB journal : official publication* of the Federation of American Societies for Experimental Biology 34 (4), S. 5193–5207. DOI: 10.1096/fj.201901506R.
- Simon, Karen (2016): Colorectal cancer development and advances in screening. In: *Clinical Interventions in Aging* 11, S. 967–976. DOI: 10.2147/CIA.S109285.
- Sun, Hongze; Wang, Rangrang; Liu, Yuan; Mei, Haitao; Liu, Xueni; Peng, Zhihai (2021): USP11 induce resistance to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer through activating autophagy by stabilizing VCP. In: *Journal of Cancer* 12 (8), S. 2317–2325. DOI: 10.7150/jca.52158.
- Szczęśniak, Paweł P.; Heidelberger, Jan B.; Serve, Hubert; Beli, Petra; Wagner, Sebastian A. (2022):
 VCP inhibition induces an unfolded protein response and apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. In: *PloS one* 17 (4), e0266478. DOI: 10.1371/journal.pone.0266478.
- Takayama, Tetsuji; Miyanishi, Koji; Hayashi, Tsuyoshi; Sato, Yasushi; Niitsu, Yoshiro (2006):
 Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. In: *Journal of gastroenterology* 41 (3), S. 185–192. DOI: 10.1007/s00535-006-1801-6.
- Tang, Zefang; Kang, Boxi; Li, Chenwei; Chen, Tianxiang; Zhang, Zemin (2019): GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. In: *Nucleic acids research* 47 (W1), W556-W560. DOI: 10.1093/nar/gkz430.
- Tanida, Isei; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki (2008): LC3 and Autophagy. In: Autophagosome and Phagosome: Humana Press, S. 77–88.
- Torrecilla, Ignacio; Oehler, Judith; Ramadan, Kristijan (2017): The role of ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in chromatin dynamics after DNA double strand breaks. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 372 (1731). DOI: 10.1098/rstb.2016.0282.
- Vega, Pablo; Valentín, Fátima; Cubiella, Joaquín (2015): Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. In: World journal of gastrointestinal oncology 7 (12), S. 422–433. DOI: 10.4251/wjgo.v7.i12.422.
- Weinberg, Robert A. (2014): The biology of cancer. Second edition. New York, NY: Garland Science. Online verfügbar unter https://www.taylorfrancis.com/books/9780429258794.
- Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (3), S. 169–178. DOI: 10.1038/35056563.
- WHO (2022a): Cancer Tomorrow. Online verfügbar unter https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&single_unit=1000000&mode=populati on&group_populations=1&multiple_cancers=0&multiple_populations=1&years=2040&cancers =39, zuletzt aktualisiert am 29.03.2022, zuletzt geprüft am 08.08.2022.
- WHO (2022b): Cancer. Online verfügbar unter https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, zuletzt aktualisiert am 04.08.2022, zuletzt geprüft am 08.08.2022.

- Wójcik, Cezary; Yano, Mihiro; DeMartino, George N. (2004): RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 2), S. 281–292. DOI: 10.1242/jcs.00841.
- Xi, Yue; Xu, Pengfei (2021): Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. In: *Translational Oncology* 14 (10), S. 101174. DOI: 10.1016/j.tranon.2021.101174.
- Yamamoto, Shinji; Tomita, Yasuhiko; Hoshida, Yoshihiko; Iizuka, Norishige; Kidogami, Shinya; Miyata, Hiroshi et al. (2004a): Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (16), S. 5558–5565. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0723-03.
- Yamamoto, Shinji; Tomita, Yasuhiko; Hoshida, Yoshihiko; Sakon, Masato; Kameyama, Masao; Imaoka, Shingi et al. (2004b): Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (2), S. 651–657. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-1576-03.
- Yamamoto, Shinji; Tomita, Yasuhiko; Hoshida, Yoshihiko; Takiguchi, Shuji; Fujiwara, Yoshiyuki;
 Yasuda, Takushi et al. (2003a): Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (13), S. 2537–2544. DOI: 10.1200/JCO.2003.12.102.
- Yamamoto, Shinji; Tomita, Yasuhiko; Nakamori, Shoji; Hoshida, Yoshihiko; Nagano, Hiroaki; Dono, Keizo et al. (2003b): Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (3), S. 447–452. DOI: 10.1200/JCO.2003.06.068.
- Yang, Zhifen; Klionsky, Daniel J. (2009): An overview of the molecular mechanism of autophagy. In: *Current topics in microbiology and immunology* 335, S. 1–32. DOI: 10.1007/978-3-642-00302-8_1.
- Yeo, Bo Kyoung; Yu, Seong-Woon (2016): Valosin-containing protein (VCP): structure, functions, and implications in neurodegenerative diseases. In: *Animal Cells and Systems* 20 (6), S. 303–309. DOI: 10.1080/19768354.2016.1259181.
- Yoneda, T.; Imaizumi, K.; Oono, K.; Yui, D.; Gomi, F.; Katayama, T.; Tohyama, M. (2001): Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. In: *The Journal* of biological chemistry 276 (17), S. 13935–13940. DOI: 10.1074/jbc.M010677200.
- Yorimitsu, T.; Klionsky, D. J. (2005): Autophagy: molecular machinery for self-eating. In: *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, S. 1542–1552. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401765.

7. Appendix



Abbildung A 1: Western Blot Quantifizierung Western Blot 48h nach CB5083-Behandlung auf angegebene Marker, s. Abb.10 B. n=3; die Auswertung erfolgte mittels ImageJ und GraphPad Prism. Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw; Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit unbehandelter Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für p≤0,05, ** für p≤0,01, *** für p≤0,001, **** für p≤0,0001



Abbildung A 2: Viabilitätsinhibition nach VCP-Knockdown MTT Assay 72h nach siRNA-Transfektion; n=3; die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism. Darstellung der Mittelwerte \pm Stabw; Statistische Auswertung mittels zweiseitigem ungepaartem Students t-Test, verglichen mit unbehandelter Kontrolle. ns= nicht signifikant, * für $p \le 0,05$, ** für $p \le 0,01$, *** für $p \le 0,001$

7.1. Curriculum vitae

7.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Adamkiewicz, Jürgen	Adhikary, Till
Bartsch, Jörg Walter	Bauer, Miriam
Bauer, Uta Maria	Brandt, Dominique
Brehm, Alexander	Brendel, Cornelia
Buchholz, Malte	Burchert, Andreas
Conrad, Matthias	Decher, Niels
Elsässer, Hans Peter	Feuser, Beate
Frech, Miriam	Fritz, Barbara
Garn, Holger	Greene, Brandon
Grgic, Ivica	Hänze, Jörg
Hertl, Michael	Huber, Magdalena
Höbenreich, Sabine	Jacob, Ralf
Jakob, Peter	Jänsch, Heinz
Kinscherf, Ralf	Lauth, Matthias
Lill, Roland	Maisner, Andrea
Mandic, Robert	Meißner, Wolfgang
Milani, Wiebke	Müller, Rolf
Müller Brüsselbach, Sabine	Mühlenhoff, Ulrich
Oliver, Dominik	Pankuweit, Sabine
Plant, Timothy David	Preisig Müller, Regina
Reinartz, Silke	Schmeck, Bernd
Stehling, Oliver	Steinhoff, Ulrich
Stiewe, Thorsten	Strauer, Dorothea
Suske, Guntram	Timmesfeld, Nina
Timofeev, Oleg	Visekruna, Alexander
Wanzel, Michael	Westermann, Reiner
Wrocklage, Christian	

7.3. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. (apl.) Dr. rer. nat. Malte Buchholz für dieses interessante Thema, die stets offene Tür, den intellektuellen Austausch und die durchdachten Ratschläge bei diversen Problemen und Unklarheiten bedanken.

Weiter möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Thomas M. Gress für die Möglichkeit in seinem Institut diese Dissertation erarbeiten zu dürfen, bedanken.

Bei Ramona Diels und Harald Schmidt möchte ich mich für die ein oder andere Hilfestellung bei kleineren oder auch größeren Problemen im Laboralltag bedanken.

Der kompletten AG Buchholz und AG Bauer danke ich für eine stets angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem danke ich Veronika Lutz, Vanessa Zimmer, Bettina Geißel und Sina Wagner für jeden Ratschlag, egal ob fachlich oder freundschaftlich.

Vor allem möchte ich Veronique Hellmund danken. Danke für die Unterstützung, das Tränen trocknen (mal vor Freude, mal vor Verzweiflung) und das gemeinsame Lachen. Ich danke dir dafür, dass du immer Schokolade für mich hattest, dass ich mich immer bei dir ausheulen durfte, dass du mir immer zugehört hast und immer einen guten Ratschlag hattest. Danke für jede Hilfe, für jedes aufbauende Wort, für jede Umarmung. Danke für diese Freundschaft!

Schlussendlich gebührt vor allem meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden der größte Dank. Danke für eure bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

7.4. Ehrenwörtliche Erklärung