

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Entwicklung eines Reportersystems zur Identifikation malignen
Gewebes anhand spezifischer Methylierungsmuster des
kolorektalen Karzinoms**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mathias Seubert

Jahr 2025

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Entwicklung eines Reportersystems zur Identifikation malignen
Gewebes anhand spezifischer Methylierungsmuster des
kolorektalen Karzinoms**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mathias Seubert

Jahr 2025

Dekan:	Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Dennis Harrer
Tag der mündlichen Prüfung:	02.12.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	6
1.1.1	Epidemiologische Überlegungen.....	6
1.1.2	Pathogenese und Ätiologie	7
1.1.3	Diagnostik und Früherkennung	11
1.1.4	Prävention und Therapiestrategien	12
1.2	Methylierung.....	14
1.2.1	Grundlagen	14
1.2.2	Mechanismen der (De-)Methylierung.....	15
1.2.3	Methylierung und das kolorektale Karzinom	16
1.3	Reportersystem zur Detektion hypermethylierter Regionen	18
1.4	Analyse der Caspase-Aktivität im Verlauf der Apoptose	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Technische Geräte.....	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3	Chemikalien und sonstige Reagenzien	27
2.1.4	Kits	28
2.1.5	Bakterien, Zellen und Organoide.....	29
2.1.6	Software und Tools.....	29
2.1.7	Zusammensetzung der Puffer und Zellkulturmedien.....	29
2.2	Zellkultur.....	31
2.2.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	31
2.2.2	Auftauen und Einfrieren der Zellen	31
2.2.3	Aussäen von Zellen.....	32
2.2.4	Transiente Transfektion von Plasmiden (Lipofektion)	32
2.2.5	Apoptose-Induktion in HCT116 Zellen	33
2.2.6	Herstellung von Lentiviren	33
2.2.7	Transduktion.....	34
2.3	Molekulargenetische Methoden.....	34
2.3.1	Erstellen von Primern und Genfragmenten	34
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
2.3.3	Overlap-PCR.....	35

2.3.4	Plasmide und Restriktionsverdau	36
2.3.5	Assemblierung von Plasmiden mittels Gibson Assembly	36
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.3.7	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	37
2.3.8	Transformation von Plasmiden in Bakterien und Bakterienkultur.....	37
2.3.9	Plasmidpräparation aus Bakterien und Sequenzierung	38
2.4	Quantifizierung von Fluoreszenz und Lumineszenz	38
2.5	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	39
2.6	Western-Blot zur Proteinanalyse	40
2.6.1	Herstellung von Zelllysaten	40
2.6.2	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	40
2.6.3	Transfer der Proteine (Immunoblot)	41
2.7	Herstellung von Methylierungslibraries	42
2.7.1	Isolation genomischer DNA	43
2.7.2	Fragmentierung der DNA	43
2.7.3	Erstellung der Methylierungslibrary.....	43
2.7.4	Next Generation Sequencing.....	44
2.8	Bioinformatische Analyse der WGS-Daten.....	44
2.9	Statistische Analyse	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Methylierungsmuster des kolorektalen Karzinoms	46
3.1.1	Evaluation der Sequenzierungsdaten zur Identifikation spezifischer Methylierungsmuster im kolorektalen Karzinom	46
3.1.2	Epigenetisches Profil: Globale Methylierungsmuster im gesunden und malignen Genom	48
3.1.3	Identifikation differenziell methylierter CpG-Loci.....	50
3.1.4	Zusammenfassung zu differenziell methylierten Regionen	50
3.1.5	In silico identifizierte hypermethylierte Biomarker	52
3.1.6	Schlüsselrolle differenziell methylierter Gene als Regulatoren der Zelle	55
3.2	Etablierung eines Methylierungsreportersystems	56
3.2.1	Evaluation des Reportersystems anhand hypermethylierter Biomarker.....	56
3.2.2	Keine unspezifische Aktivierung der flipNluc durch das MBD-Konstrukt	58
3.2.3	Freisetzung der splitTEV-Protease durch Intein-Splicing	59
3.2.4	Modifiziertes splitTEVp-Intein-Konstrukt induziert flipNluc effizienter.....	61
3.2.5	Modifiziertes splitTEVp-Intein-Konstrukt zur Optimierung des Reportersystems.....	63
3.3	Bindet dCas9 bevorzugt innerhalb unmethylierter Regionen?	65

3.4	Triple Caspase Aktivitätsassay	67
3.4.1	Transfektion der Einzelsysteme zur real-time Detektion der Caspasen-3, -8 & -9	67
3.4.2	Proof of Concept Triple Caspase Aktivitätsassay	69
3.4.3	Stabiler Knock-In des Triple Caspase Assays in HCT116.....	72
4	Diskussion	73
4.1	Methylierungsmuster maligner Zellen und Identifikation neuer hypermethylierter Biomarker-Kandidaten	74
4.2	Etablierung eines Systems zur Detektion hypermethylierter CpG-Inseln.....	77
4.3	Hängt die Affinität der dCas9 vom Methylierungsgrad der genomischen Zielstruktur ab? .	81
4.4	Einblicke in Apoptose-Signalwege durch real-time Caspasen-Detektion	82
4.5	Limitationen dieser Arbeit.....	85
4.6	Ausblick	86
5	Zusammenfassung.....	88
6	Abkürzungen.....	90
7	Literaturverzeichnis	93
8	Anhang.....	109
9	Eigenständigkeitserklärung	112
10	Danksagung	113
11	Lebenslauf.....	114

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologische Überlegungen

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eine maligne Erkrankung, die trotz intensiver Forschungsbemühungen der vergangenen Jahrzehnte eine erhebliche Krankheitslast darstellt, geprägt durch hohe Mortalität und Prävalenz. Weltweit steht das KRK an zweiter Stelle der krebsassoziierten Todesfälle [1]. Allein in den USA werden für das Jahr 2025 über 154.000 Neuerkrankungen und über 52.000 Todesfälle erwartet [2]. Diese Herausforderung spiegelt sich auch auf globaler Ebene mit einer aktuellen geschätzten Jahresinzidenz von ca. 1,9 Millionen Neuerkrankungen und knapp 0,9 Millionen Todesfällen wider [1,3,4]. Auch in Zukunft wird dieser Trend durch ungebrochen steigende Fallzahlen gekennzeichnet sein. So prognostizieren *Morgan et al.* zwischen 2020 und 2040 einen Inzidenzanstieg um 63 % [3]. Während vor allem sozioökonomisch stärkere Länder eine stagnierende bis fallende Entwicklung bezüglich Inzidenz und Mortalität älterer Patientengruppen aufweisen, steigen insbesondere in strukturell schwächeren Regionen diese Kennzahlen jedoch in den letzten Jahrzehnten an [5]. Außerdem ist eine zunehmende Inzidenz des *early-onset*¹ KRK zu verzeichnen. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um ein kolorektales Karzinom, welches sich vor dem 50. Lebensjahr manifestiert [1]. Der Anteil der Patienten² unter 55 Jahren mit diagnostiziertem KRK stieg von 11 % im Jahr 1995 auf 20 % im Jahr 2019 [6]. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte Exposition gegenüber diversen Risikofaktoren sowie auf ein vermindertes protektives Verhalten in dieser jüngeren Bevölkerungsgruppe zurückzuführen [1]. Insbesondere mangelnde körperliche Aktivität, ein ungünstiges Ernährungsverhalten und die zunehmende Prävalenz von Adipositas im Rahmen eines metabolischen Syndroms werden hiermit in Verbindung gebracht [2,6–8]. Neben der zunehmenden Bedeutung des *early-onset* KRK zeigt sich seit etwa 2010 eine Tendenz hin zu einer Diagnosestellung in fortgeschritteneren Stadien, was mit einer herausfordernden Therapie einhergeht [9].

Diese epidemiologischen Beobachtungen verdeutlichen die Notwendigkeit, neben primärpräventiven Maßnahmen neuartige Therapieansätze sowie effizientere und einfach

¹ Für etablierte Fachbegriffe wird ebenso wie für die Bezeichnungen von Genen der englische Begriff beibehalten.

² In dieser Arbeit wird zur besseren Leserlichkeit das generische Maskulin verwendet. Sofern nicht explizit erwähnt, werden hiermit sämtliche Geschlechter angesprochen.

anwendbare *Screening*-Methoden zu etablieren [6]. *Meester et al.* prognostizieren, dass durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen bei 80 % der über 50-Jährigen allein in den USA innerhalb von 20 Jahren bis zu 200.000 Todesfälle verhindert werden könnten [10].

1.1.2 Pathogenese und Ätiologie

Beim KRK liegt histologisch in über 90 % der Fälle ein Adenokarzinom vor, das vom intestinalen Epithel ausgeht [11,12]. Verglichen mit anderen Organen ist der Verdauungstrakt relativ anfällig für maligne Entartung, da die rasche Epithelerneuerung alle 3-5 Tage durch häufige Zellteilung zahlreiche Gelegenheiten für die Einführung onkogener Mutationen bietet [13]. Weitere Tumoren des Kolons und Rektums umfassen Siegelringkarzinome, Sarkome, neuroendokrine Tumoren, Plattenepithelkarzinome sowie Lymphome [11]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem häufigsten Subtyp, dem Adenokarzinom.

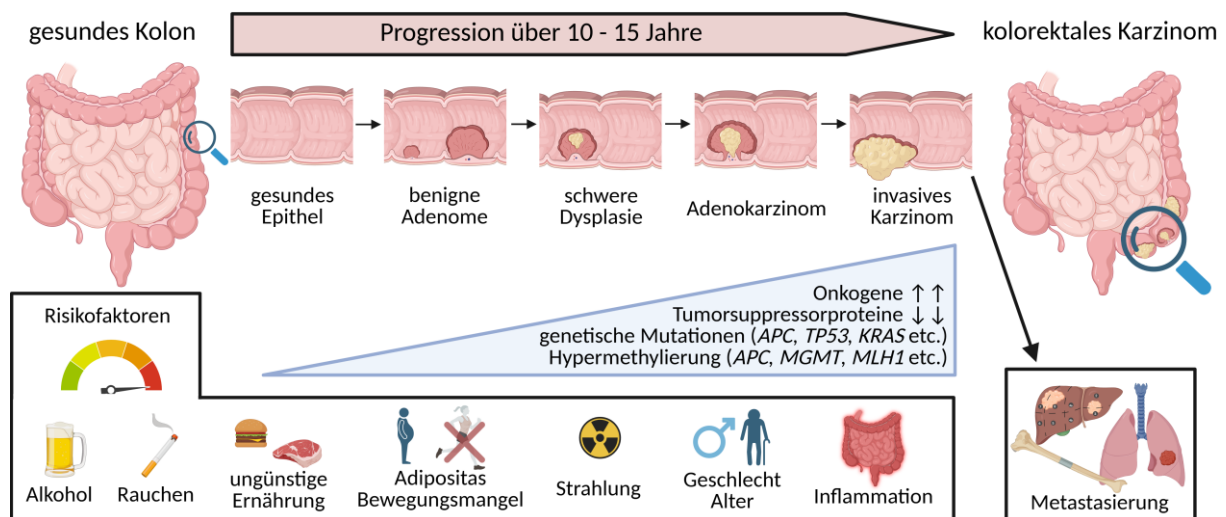


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz und Risikofaktoren des KRK. Die Entwicklung des KRK erfolgt typischerweise über mehrere Jahre hinweg aus gesundem Epithel über benigne Adenome und präkanzeröse Läsionen. Im Laufe der Karzinogenese kommt es durch diverse genetische sowie epigenetische Mutationen zur Repression von Tumorsuppressorproteinen. Die Entstehung des KRK wird durch zahlreiche Risikofaktoren begünstigt. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

Krebs entsteht durch die Transformation gesunder Zellen in atypische, maligne Zellen. Diese sind durch ungehemmte Proliferation, Gewebeinvasion und metastatische Absiedlungen gekennzeichnet [14]. Der Übergang zu atypischen Zellen wird als Karzinogenese bezeichnet und durch Schädigung zellulärer DNA initiiert [11]. Genetische und epigenetische Veränderungen spielen hierbei eine zentrale Rolle, indem sie Onkogene verstärkt aktivieren und Tumorsuppressorgene deaktivieren, was zu einem unregulierten Zellzyklus und verringerter Apoptose maligner Zellen führt [14,15]. Auf die Einführung von Mutationen folgt

die Proliferation und schließlich die Metastasierung von Krebszellen [11]. Der Entartungsprozess von gesundem Gewebe hin zum KRK führt über präkanzeröse Zwischenstufen wie Adenome hin zum invasiven Adenokarzinom, was in einem Zeitraum von 10-15 Jahren geschieht [16,17]. Während dieses Zeitraums akkumulieren entsprechend der *multiple-hit* These verschiedene genetische und epigenetische Mutationen und führen so letztlich zur Entwicklung eines malignen Tumors [11,18]. Das KRK weist die typischen Charakteristika von Malignomen auf, wie durch *Hanahan & Weinberg* beschrieben: konstante Proliferationsreize, Invasivität, permanente Replikationsfähigkeit, verstärkte Angiogenese, Resistenz gegenüber Zelltod, tumorsuppressiven Einflüssen und Immunreaktion sowie ein veränderter zellulärer Energiemetabolismus [19].

Neben der histologischen Klassifizierung lässt sich das KRK anhand der molekularen Pathomechanismen einteilen, die während der Tumorgenese ablaufen [11]. Hierbei handelt es sich um chromosomale Instabilität (CIN), fehlerhafte *Mismatch*-Reparatur (MMR) sowie den *CpG-island methylator phenotype* (CIMP) [17]. Diese Prozesse sind jedoch nicht als strikt voneinander getrennte Konstrukte zu verstehen, sondern besitzen oftmals Überlappungen und treten in Mischformen auf [11].

Der CIN-Signalweg wird durch das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben und spielt eine zentrale Rolle bei ca. 80 % aller KRK-Erkrankungen [20]. Hierbei wird durch genetische Mutationen die Balance zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gestört. Oftmals beginnt dieser Prozess mit einer Mutation des *APC*-Gens [11,17]. Unter physiologischen Bedingungen dient es als Tumorsuppressorprotein, indem es durch Bindung an β -Catenin den Wnt-Signalweg und somit die Zellproliferation reguliert. Ein Funktionsverlust von *APC* geht entsprechend mit unkontrollierter Zellproliferation einher [21]. Weiterhin mutieren während der CIN-Karzinogenese sowohl die Onkogene *KRAS* & *PIK3CA* als auch die Tumorsuppressorgene *TGF- β* & *TP53* [20,22–24]. Insbesondere *TP53* ist in seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ für die Kontrolle des Zellzyklus bekannt und kann bei Störungen tumorproliferativ wirken [22–29]. Durch Mutationen des *TGF- β* -Signalwegs können entartete Zellen der Apoptose entgehen und somit ihre Überlebensfähigkeit steigern [11].

Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kann bei Mutationen der *Mismatch*-Reparatur-Gene festgestellt werden [17]. Mikrosatelliten sind kurze Sequenzen, die etwa 3 % des menschlichen Genoms ausmachen [11]. Aufgrund der Sequenzwiederholungen innerhalb der Mikrosatelliten, führt der Verlust einer effizienten *Mismatch*-Reparatur bevorzugt in diesen

Regionen zu einer Akkumulation von Mutationen. Der MSI-Status eines Tumors besitzt auch therapeutische Implikationen: Bei hochgradigem MSI-Status weisen sie ein schlechteres Ansprechen auf das Chemotherapeutikum 5-FU auf [17,30].

Sporadisch auftretende KKR erwerben eine MSI beispielsweise durch Methylierung des MMR-Gens *MLH1*, wie sie unter anderem bei Karzinomen des CIMP auftritt [30]. Der CIMP ist durch aberrante Hypermethylierung von CpG-Inseln gekennzeichnet. Solche CpG-Inseln befinden sich bevorzugt in Promotorregionen und besitzen bei über 50 % der Gene einen regulatorischen Einfluss auf deren Expression [11,20]. Tumorsuppressorgene werden durch Hypermethylierung im Rahmen des epigenetischen *Gene Silencing* herunterreguliert, was zur Tumorproliferation führt [31,32]. Auf epigenetische DNA-Methylierung wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen.

Bei Vorliegen hereditärer Syndrome tritt das KKR teils stark gehäuft auf. Solche Syndrome sollten insbesondere bei Erstdiagnose eines Karzinoms bei jungen Patienten in Betracht gezogen werden, wenngleich die meisten *early-onset* Karzinome sporadisch entstehen [9]. Bei etwa 9,9 % der KKR-Patienten besteht eine Prädisposition in Form genetischer Mutationen. Das autosomal-dominant vererbte Lynch-Syndrom (LS) findet sich bei etwa 3 % der Patienten [33]. Pathophysiologisch können hierbei Keimbahnmutationen der MMR-Gene (u.a. *MLH1*, *MSH2*) oder eine Deletion innerhalb von *EpCAM* vorliegen [33,34]. Da typischerweise initial nur ein Allel die Mutation trägt, muss für den Funktionsverlust des MMR-Systems auch das zweite Allel geschädigt werden. Dies geschieht in Form eines *second hit* meist somatisch durch Mutationen oder epigenetische Methylierung [34,35]. Aufgrund der defizitären DNA-Mismatch-Reparatur findet sich bei Tumoren im Rahmen eines LS meist eine MSI. Diese Eigenschaft kann im Rahmen der Diagnostik bei Verdacht auf einen LS-assoziierten Tumor eingesetzt werden [34]. Da die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung eines KKR beim Lynch Syndrom je nach Mutation bei bis zu 50 % liegt, wird gemäß der S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* eine humangenetische Beratung und Diagnostik von Familienangehörigen empfohlen [36,37].

Neben dem LS gilt auch die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) als autosomal-dominant vererbte Krankheit, welche für etwa 1 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich ist [38]. Bei der FAP können diverse Mutationen innerhalb des *APC*-Gens vorliegen, die nach somatischer Mutation des zweiten Allels letztlich einen Funktionsverlust des Tumorsuppressors zur Folge haben [21,38]. In Folge führt die überschießende

Zellproliferation zur Bildung von hunderten Adenomen, die wiederum entarten können. Die Schwere dieses Gendefekts wird durch eine Lebenszeitprävalenz von 100 % für die Entstehung eines KRK bei unbehandelter FAP verdeutlicht [38]. Aufgrund dieser Prognose ist eine engmaschige Überwachung durch Koloskopien indiziert. Derzeit wird eine möglichst kontinenzerhaltende Proktokolektomie zur Prophylaxe kolorektaler Karzinome bei FAP empfohlen [37].

Neben genetischer Prädisposition wird das Risiko für die Entwicklung eines sporadischen KRK durch diverse Faktoren beeinflusst [1,11]. Hierzu zählt unter anderem das metabolische Syndrom und die Adipositas, die ab einem BMI ≥ 30 mit einer um 41 % erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit einhergeht [39]. Ein Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen Übergewicht und erhöhter KRK-Inzidenz liegt in der vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und Insulin [1]. Oftmals tritt Adipositas zusammen mit einem Bewegungsmangel auf [40]. Regelmäßige körperliche Aktivität führt hingegen zu einer Reduktion des relativen Risikos um 30 % bis 50 % [1]. Dieser protektive Effekt fällt bei einem überwiegend sitzenden Lebensstil, wie er in der westlichen Welt zunehmend zu beobachten ist, weg und führt somit zu einer erhöhten KRK-Inzidenz [40,41]. Auch nutritive Gewohnheiten sind für die Entwicklung maligner Entartung des Verdauungstrakts von zentraler Bedeutung [1]. Demnach stellt die vermehrte Zufuhr verarbeiteter, ballaststoffarmer Lebensmittel einen Risikofaktor dar [42]. Rauchen bewirkt mit einer relativen Risikosteigerung um 20 % ebenso wie der Alkoholkonsum bereits in geringen Mengen eine erhöhte Erkrankungsanfälligkeit [43,44]. Bei täglicher Zufuhr von ≥ 4 alkoholischen Getränken erhöht sich das KRK-Risiko um 52 % [44]. Dieser Effekt wird nach Untersuchungen von *Zhou et al.* unter anderem durch Hypermethylierung von CpG-Inseln vermittelt [45].

Zusätzlich zu den genannten modifizierbaren Risikofaktoren können weitere nicht beeinflussbare Größen identifiziert werden. So geht das männliche Geschlecht mit einem um 40 % erhöhten Risiko einher [1,4]. Auch höheres Alter, eine positive Familienanamnese, Zustand nach abdomineller Strahlentherapie, chronisch inflammatorische Darmerkrankungen sowie die individuelle Zusammensetzung des Mikrobioms gehören zu den nicht modifizierbaren Einflussgrößen [1].

Präventive Maßnahmen sowie Programme zur frühzeitigen Detektion präkanzeröser Läsionen bei der asymptomatischen Bevölkerung werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Sie

können bei konsequenter Umsetzung zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität und Inzidenz führen [46].

1.1.3 Diagnostik und Früherkennung

Die klinische Präsentation des kolorektalen Karzinoms hängt maßgeblich von der Tumorlokalisation, Größe sowie dem Metastasierungsstatus ab. Insbesondere in frühen Stadien treten unspezifische Symptome auf. Plötzliche Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Blutbeimengungen, Anämie und eine allgemeine Leistungsminderung mit möglicher B-Symptomatik sollten eine weiterführende Diagnostik veranlassen. Mit zunehmender Tumorgöße kann eine Ileussyndromatik sowie eine tastbare abdominale Resistenz hinzukommen [16,17,47]. Bei klinischem Verdacht auf ein KRK soll zunächst eine Koloskopie des gesamten Kolons bis zum Cäcum durchgeführt werden. Bei unvollständiger Durchführung (beispielsweise aufgrund von Stenosen) soll sie durch eine Computertomografie ergänzt werden [37]. Im Rahmen endoskopischer Untersuchungen können aufgefundene Adenome in gleicher Sitzung entfernt und aus suspekten Arealen Biopsien gewonnen werden [17,37]. Nach histologischer Sicherung eines KRK erfolgen bildgebende Staging-Untersuchungen zur Ausbreitungsdiagnostik sowie die Bestimmung des Tumormarkers CEA [37]. Dieser ist oftmals bereits bei Erstdiagnose erhöht und ermöglicht durch Verlaufskontrollen die frühzeitige Detektion eines Rezidivs [48].

Da das KRK oftmals aus gesundem Gewebe über Adenome oder sessile Läsionen während eines mehrjährigen Zeitraums entsteht, bietet dieses Intervall die Möglichkeit der Früherkennung auch bei asymptomatischen Patienten [49]. Die Wirksamkeit verschiedener *Screening*-Methoden hinsichtlich der Mortalitätsreduktion wurde durch eine Metaanalyse belegt, was die Chancen einer weiterführenden Verbesserung dieser Programme verdeutlicht [50]. In Deutschland wird leitliniengerecht für die asymptomatische Bevölkerung eine strukturierte KRK-Früherkennung ab einem Alter von 50 Jahren empfohlen, wobei die qualitätsgesicherte Koloskopie weiterhin als Goldstandard gilt [37]. Kürzlich konnte eine randomisierte kontrollierte Studie von *Bretthauer et al.* eine relative Risikoreduktion bei angenommener 100 %-iger *Screening*-Adhärenz von $RR = 0,69$ bezüglich der KRK-Inzidenz und von $RR = 0,5$ bezüglich der KRK-assoziierten Mortalität zeigen [51]. In der Realität wird die Koloskopie allerdings nicht durch alle Patienten angenommen, was zu einer geringeren Teilnahmequote und somit einer verminderten *Screening*-Effizienz führt [50,52]. Eine

Optimierung der Adhärenz kann unter anderem durch den Einsatz nicht-invasiver diagnostischer Verfahren erreicht werden, die durch etliche Patienten bevorzugt werden [50,53].

Der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) zählt zu diesen nicht-invasiven Methoden. Hierbei wird makroskopisch unsichtbares Blut detektiert, das von Adenomen und Karzinomen abgegeben wird [1]. Kürzlich konnte eine prospektive schwedische Studie eine statistisch signifikante Mortalitätsreduktion von 14 % nachweisen, wenn Patienten alle zwei Jahre zum Stuhltest eingeladen wurden [54]. Außerdem ermöglicht die DNA-Isolierung aus entarteten Kolonepithelzellen in Stuhlproben den Nachweis charakteristischer Mutationen wie Hypermethylierung [46]. Die Kombination mehrerer DNA-Marker mit dem Nachweis von okkultem Blut verbessert die Aussagekraft dieser *Screening*-Methoden [1,55]. Genetische Biomarker werden in der aktuellen S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* jedoch aufgrund eines ungünstigen Kosten-Nutzen-Verhältnis nicht für das *Screening* der asymptomatischen Bevölkerung empfohlen [37]. Diesbezüglich bleibt die zukünftige Entwicklung jedoch abzuwarten, da die Etablierung neuer Genpanels mit einer stetigen Verbesserung der Sensitivität und Spezifität einhergeht [56]. Neben der aufgeführten stuhlbasierten Verfahren besitzen auch Bluttests vielversprechende Ansätze, wie etwa die Bestimmung des Methylierungsstatus der Gene *SEPT9* (Epi proColon, Epigenomics AG), *SDC2* oder *BCAT1* aus isolierter DNA [55,57].

Zukünftig könnten individualisierte Konzepte mit risikoadaptierten Intervallen zwischen *Screening*-Untersuchungen deren Effektivität und Effizienz optimieren [1]. Eine Verbesserung nicht-invasiver Testverfahren ist vonnöten, um auch jene Teile der Bevölkerung zu erreichen, die eine Vorsorgekoloskopie ablehnen. Außerdem könnte angesichts der Zunahme von *early-onset* Karzinomen ein früherer Beginn der Vorsorgeuntersuchungen ab einem Alter von 45 Jahren zu einer weiteren Mortalitätsreduktion führen [50].

1.1.4 Prävention und Therapiestrategien

Zu den wichtigsten primärpräventiven Maßnahmen zählt die Optimierung modifizierbarer Risikofaktoren. Entsprechend senken diätetische Maßnahmen wie die ausreichende Zufuhr von Ballaststoffen, eine Alkohol- und Nikotinkarenz sowie vermehrte Bewegung das Erkrankungsrisiko [40,41]. Eine ausführlichere Erläuterung der Risikofaktoren findet sich in Abschnitt 1.1.2. Zudem vermitteln einige Medikamente präventive Effekte. Die größte Evidenz

liegt für Acetylsalicylsäure vor, wobei die langfristige Einnahme von ≥ 75 mg pro Tag mit einer Inzidenzreduktion von 24 % und einer Verminderung der KRK-spezifischen Mortalität um 40 % einhergeht [58]. Aufgrund einer unzureichenden Beurteilung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses wird aktuell allerdings keine Chemoprävention empfohlen [37]. Etablierte *Screening*-Programme tragen neben der frühzeitigen Detektion des KRK im Rahmen der Sekundärprävention auch zur Primärprävention bei, wenn präkanzeröse Läsionen wie Adenome entdeckt und entfernt werden [6,50].

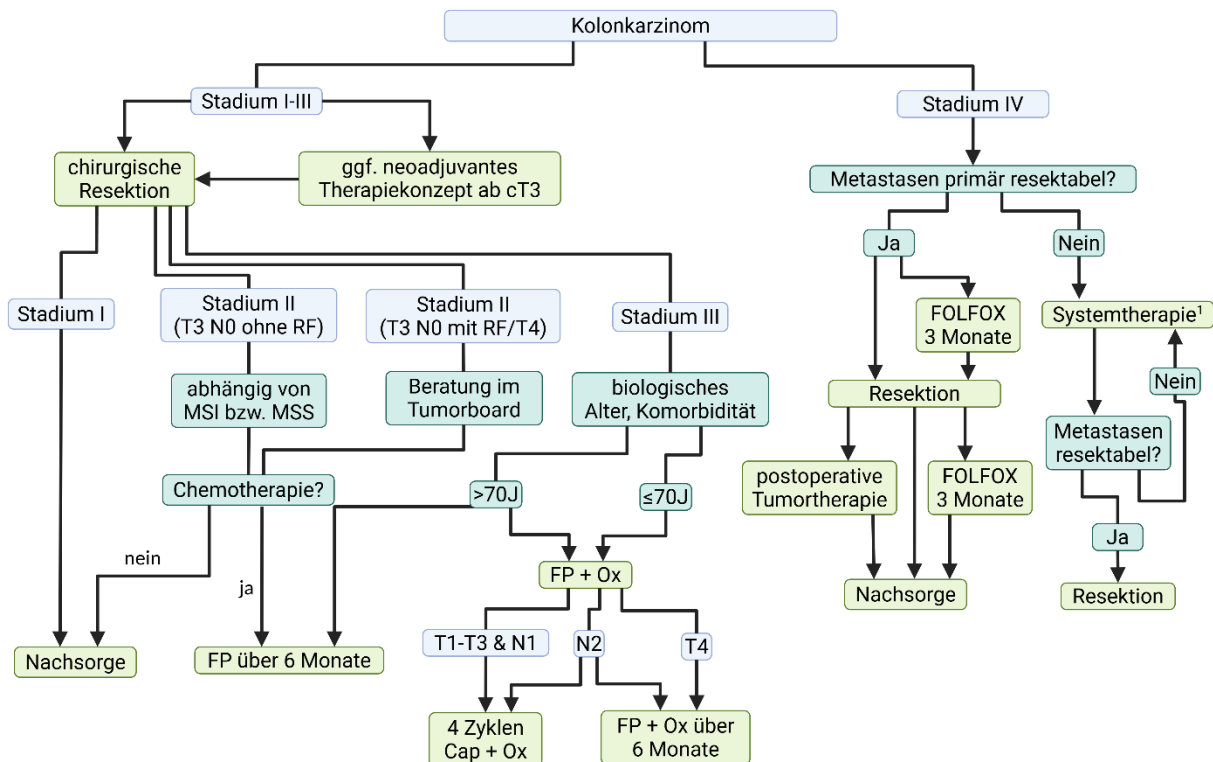


Abbildung 2: Therapiealgorithmus des Kolonkarzinoms. Je nach UICC-Stadium kommen verschiedene Therapiestrategien zur Behandlung des Kolonkarzinoms in Betracht. Die Stadien I-III werden primär in kurativer Intention therapiert, wobei die chirurgische Resektion des Tumors von zentraler Bedeutung ist. Im metastasierten Stadium IV werden die malignen Absiedlungen bei vorhandener Operabilität reseziert oder andernfalls eine Systemtherapie durchgeführt, um sie in Remission zu bringen und somit eine sekundäre Resektabilität zu erreichen. T und N entsprechen der Einteilung gemäß der TNM-Klassifikation für das KRK. Dargestellt wird hier die Therapie des Kolonkarzinoms, die sich von der des Rektumkarzinoms unterscheidet.

¹Die Systemtherapie beinhaltet je nach molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors zahlreiche zielgerichtete Therapien: u.a. Pembrolizumab (Anti-PD-1), Bevacizumab (Anti-VEGF), Cetuximab (Anti-EGFR), Encorafenib (BRAF-Inhibitor), Ipilimumab (Anti-CTLA-4) sowie Tyrosinkinaseinhibitoren.

(RF = Risikofaktoren; FP = Fluoropyrimidin; Cap = Capecitabin; Ox = Oxaliplatin; FOLFOX = 5-FU, Folsäure & Oxaliplatin) Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt, angepasst an den Onkopedia-Therapiealgorithmus entsprechend der S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* [37,59].

Die Therapie des Kolonkarzinoms erfolgt in den UICC-Stadien I–III in kurativer Intention, wobei die radikale chirurgische Resektion des Tumors mit entsprechendem Sicherheitsabstand und Lymphknotenexzision eine wichtige Säule einnimmt. Im Rahmen dieser Übersicht wird auf die

Therapie des Kolonkarzinoms eingegangen, welche sich von der des Rektumkarzinoms unter anderem durch die untergeordnete Rolle der Strahlentherapie unterscheidet. Ab UICC-Stadium II wird je nach Risikostratifizierung eine adjuvante Chemotherapie erwogen, gegebenenfalls ergänzt durch eine neoadjuvante Vorbehandlung des Karzinoms. Als klassische Chemotherapeutika werden primär Fluoropyrimidine wie 5-FU/Folinsäure und Capecitabin sowie Platinderivate eingesetzt. Zielgerichtete Antikörpertherapien werden vor allem im metastasierten Stadium IV verwendet. In Abhängigkeit von der molekulargenetischen Mutationsanalyse kommen beispielsweise Cetuximab (Anti-EGFR), Bevacizumab (Anti-VEGF) oder der Immuncheckpointinhibitor Pembrolizumab (Anti-PD-1) zum Einsatz. Zur Qualitätssicherung der Therapie sollen alle Patienten mit KRK in einer interdisziplinären Tumorkonferenz vorgestellt werden [16,17,37]. Hierbei sollten auch Erkenntnisse aktueller Studien, etwa der BREAKWATER-Studie, in die individuelle Therapieempfehlung für definierte Subgruppen einfließen [37,60]. Klassische Chemotherapeutika weisen zahlreiche Nebenwirkungen auf, weil sie aufgrund ihres unspezifischen Wirkmechanismus alle sich teilenden Zellen des Körpers angreifen und dort zu Schäden führen. Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen gehören Mukositis, Störungen des Verdauungstrakts mit Übelkeit und Erbrechen, Neutropenie im Rahmen einer Myelosuppression sowie eine Neuropathie, die dosislimitierend und persistierend sein kann [61,62].

1.2 Methylierung

1.2.1 Grundlagen

Die Epigenetik beschäftigt sich mit Veränderungen der Genfunktion und -Expression, die nicht durch Mutationen der Gensequenz sondern durch andere Mechanismen zustande kommen [63]. Die DNA-Methylierung ist Gegenstand intensiver Forschung auf diesem Gebiet der Epigenetik und weist krebsassoziierte Charakteristika auf, welche bereits 1983 durch *Feinberg & Vogelstein* beschrieben wurden [64]. Diese Modifikation erfolgt durch die kovalente Anlagerung von Methylgruppen des Donors S-Adenosylmethionin an Cytosinbasen und wird durch die Familie der DNA-Methyltransferasen (Dnmt) vermittelt [63]. Bei Säugetieren betrifft die Methylierung primär jene Cytosinbasen, auf die ein Guanin folgt (sogenannte CpG-Loci). Bei Betrachtung des gesamten Genoms liegt der Großteil dieser CpG-Loci in methylierter Form vor, wobei der Anteil von 5-Methylcytosin (5mC) im Gehirn mit 1 %

am höchsten ist [65,66]. Dieses verhältnismäßig seltene Vorkommen von 5mC ist auf die Depletion des Genoms von CpG-Loci zurückzuführen, da 5mC durch Deaminierung zu Thymin mutagenes Potenzial besitzt [63].

CpG-Inseln sind genomische Regionen mit hoher CpG-Dichte und wenigen Kilobasenpaaren Länge, die bevorzugt innerhalb von Promotorregionen lokalisiert sind. Dort sind Cytosinbasen meist unmethyliert, was sie von den überwiegend methylierten CpG-Loci in anderen genomischen Regionen unterscheidet [31,63]. Unmethylierte CpG-Inseln wirken über eine Beeinflussung der Chromatinstruktur und die Bindung von Transkriptionsfaktoren zugunsten der Genexpression [63]. Im Gegensatz dazu führen hypermethylierte CpG-Inseln im Rahmen des epigenetischen *Gene Silencing* zu einer reduzierten Genexpression [31]. Zusammen mit weiteren epigenetischen Mechanismen ist die DNA-Methylierung für das genomische Imprinting, die X-Chromosom-Inaktivierung, das *silencing* retroviraler Elemente und die Embryonalentwicklung von zentraler Bedeutung [63]. In der Umgebung von CpG-Inseln befinden sich *CpG-Shores* mit ähnlichen Eigenschaften, die durch differenzielle Methylierung zur Ausprägung von gewebsspezifischen Genexpressionsmustern führen [31,32]. Abhängig von der Lokalisation kann die Methylierung auch mit gesteigerter Genexpression einhergehen, beispielsweise bei Auftreten nach dem ersten Exon eines Gens [63].

Letztlich wird die Transkription durch das Zusammenspiel mehrerer epigenetischer Mechanismen reguliert. In hypermethylierten Regionen werden Enzyme zur Histonmodifikation rekrutiert, wobei Histondeacetylasen sowie Histonmethyltransferasen zu einer stabilen Expressionsrepression führen. Auch Polycomb-Proteine sowie nichtkodierende RNA tragen zur weiteren Konsolidierung des *Gene Silencing* bei [31,63]. Abschnitte mit aktiver Transkription werden hingegen vor Cytosinmethylierung geschützt und bestehende Methylierung kann unter anderem durch die Ten-Eleven-Translokase 1 (*TET1*) abgebaut werden [31,67].

Aberrante Methylierungsmuster spielen eine Rolle in der Pathogenese diverser Krankheiten und Tumoren, wodurch sich innovative Möglichkeiten für diagnostische Methoden und zielgerichtete Therapien eröffnen [63].

1.2.2 Mechanismen der (De-)Methylierung

Im Folgenden wird die enzymatische DNA-Methylierung durch *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b* erläutert. *Dnmt1* dient dabei primär der Aufrechterhaltung bestehender Methylierung, indem

es sich während der DNA-Replikation an die Replikationsgabel anlagert und das Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang überträgt [31]. Außerdem ist *Dnmt1* durch die Präferenz für hemimethylierte DNA in der Lage, an einseitig spontan demethylierten CpG-Loci das ursprüngliche Methylierungsmuster wiederherzustellen [63]. Die Einführung neuer Methylierung wird in differenzierten Zellen von *Dnmt3a* katalysiert und ebenfalls von *Dnmt3b*, die vor allem während der Embryonalentwicklung exprimiert wird [31,63]. Die essentielle Rolle von *Dnmt1* sowie *Dnmt3b* im Rahmen der Entwicklung wird durch die fehlende embryonale Überlebensfähigkeit entsprechender Knockout-Mäuse unterstrichen [68,69]. Zwar ist noch nicht abschließend geklärt, wie genomische Regionen für die *de novo* Methylierung gezielt ausgewählt werden, jedoch handelt es sich vermutlich um verschiedene Mechanismen. Transkriptionsfaktoren können die Bindung der Methyltransferasen beeinflussen und dadurch zu regionaler Methylierung führen. Auf diese Weise werden auch CpG-Inseln vor Methylierung geschützt [70]. Ebenso kann die Interaktion mit weiteren epigenetischen Prozessen zur *Dnmt*-Rekrutierung beitragen [31,63].

Im Gegensatz zum Methylierungsprozess erfolgt die Demethylierung sowohl aktiv auf verschiedenen Wegen als auch passiv. Passive Demethylierung geschieht im Rahmen der DNA-Replikation bei verminderter *Dnmt1*-Aktivität, sodass der neu synthetisierte Strang weniger 5mC enthält und das Methylierungsniveau im Laufe der Zeit sinkt [63]. Aktive Demethylierung führt über verschiedene Prozesse letztlich zu einem Basen-*Mismatch*, der mithilfe der Basen-Exzisionsreparatur zum Einbau eines unmethylierten Cytosins führt [71]. Ein *G/T-Mismatch* entsteht beispielsweise bei der Umwandlung von 5mC zu Thymin durch AID/APOBEC. Auch TET-Enzyme können durch das Hinzufügen einer Hydroxylgruppe an 5mC und anschließender Oxidation Produkte erzeugen, die durch die Basen-Exzisionsreparatur erkannt werden [63,71]. Die Prozesse der Methylierung und Demethylierung lassen sich zusammenfassend als dynamisches Konstrukt verstehen, das sich in Abhängigkeit externer Faktoren ständig im Wandel befindet [63].

1.2.3 Methylierung und das kolorektale Karzinom

Neben globaler Hypomethylierung sind bei malignen Tumorerkrankungen auch Hypermethylierungen charakteristischer CpG-Inseln in Promotorregionen zu beobachten [64,72]. Hypomethylierung betrifft dabei primär retrovirale Elemente der DNA sowie repetitive Satelliten-DNA, was zu genomischer Instabilität mit der Aktivierung von

Onkogenen führt [31]. Hypermethylierung von CpG-Inseln vermindert hingegen direkt und indirekt die Expression von Tumorsuppressorgen [32]. Normalerweise wird die Methylierung von CpG-Inseln durch die Bindung von Proteinen und Transkriptionsfaktoren, die einer *Dnmt*-Bindung entgegenwirken, verhindert. Dieser Schutz kann jedoch im Rahmen der Karzinogenese entfallen [63]. Dieser epigenetische Prozess tritt zu Beginn der Tumorentwicklung auf und führt zur reduzierten Expression von Tumorsuppressorgen [31]. Die Entdeckung hypermethylierter Gene beim KHK führte zur deren Evaluation als prognostische und diagnostische Biomarker [73]. Zu den bekanntesten hypermethylierten Genen zählen *APC*, *MLH1* und *SEPT9*. So führt die Inaktivierung des MMR-Gens *MLH1* durch Hypermethylierung bei Tumoren mit CIMP zur MSI und ist damit treibende Kraft der genetischen Instabilität [65,74]. Außerdem wurde durch *Guinney et al.* eine molekularbiologische Klassifizierung des KHK etabliert, die auch den Methylierungszustand berücksichtigt [75]. Demnach weisen proximale Tumoren des Kolon in bis zu 40 % der Fälle einen CIMP auf [65]. Auf Basis der molekulargenetischen KHK-Einteilung können prognostisch die Ansprechraten auf 5-FU-haltige Chemotherapien abgeschätzt werden, wenngleich derartige Scores bisher keinen Eingang in die klinische Praxis gefunden haben [65,73]. Mit *SEPT9* befindet sich bereits ein Biomarker zur KHK-Früherkennung in klinischer Anwendung. Dieser Marker kann prospektiv auch zur Evaluation des chirurgischen Therapieerfolgs sowie zur Rezidiverkennung eingesetzt werden, wobei die Sensitivität dem bisher etablierten CEA wohl überlegen ist [76]. Auch weitere Marker zeigen insbesondere in Kombination vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich ihrer diagnostischen Eignung [56,73].

Bereits seit etwa 20 Jahren sind demethylierende Wirkstoffe zur Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie und des myelodysplastischen Syndroms zugelassen. Azacitidin (Vidaza, Celgene) fungiert als Pyrimidin-Analogon und wird nach entsprechender Metabolisierung sowohl in die RNA als auch DNA eingebaut. Dies führt zur Reduktion der Proteinsynthese und zur Hemmung der Methyltransferasen. Hieraus resultiert ein demethylierender Effekt, welcher das gesamte Genom betrifft und letztlich die Re-Expression zuvor durch Promotormethylierung inaktiver Gene bewirkt [65]. Nachdem es sich jedoch um keinen zielgerichteten Ansatz handelt, können auch Onkogene verstärkt exprimiert werden und somit tumorproliferative Eigenschaften vermitteln. Daher werden zielgerichtete Strategien erforscht, die mittels dCas9 an spezifischen genetischen Regionen über lokale Methylierung oder Demethylierung die

Genexpression verändern [77]. Beispielsweise konnte *Li et al.* durch Demethylierung des *SLC5A7*-Promotors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein reduziertes Tumorwachstum durch *p53*-Stabilisierung demonstrieren [28,78]. Bisherige Phase-2-Studien für den Einsatz demethylierender Wirkstoffe beim KHK konnten jedoch keine befriedigenden Verbesserungen des Outcomes zeigen, weshalb sie derzeit nicht zur Therapie etabliert sind [79].

Zusammenfassend lässt sich die Bedeutung der spezifischen Hypermethylierung bei malignen Erkrankungen wie dem KHK für die Verwendung als Biomarker und potenzielles therapeutisches Ziel feststellen.

1.3 Reportersystem zur Detektion hypermethylierter Regionen

Die spezifische Früherkennung von Krebszellen ermöglicht sowohl diagnostische Anwendungen als auch perspektivisch Ansätze zur zielgerichteten Therapie. Zur Unterscheidung maligner von gesunden Zellen anhand charakteristisch hypermethylierter CpG-Inseln hat unsere Arbeitsgruppe ein neues Reportersystem entwickelt [80].

Dieses Reportersystem besteht aus zwei Konstrukten, wobei Konstrukt 1 („dCas9-Konstrukt“) spezifisch an festgelegte Genloci bindet und sich Konstrukt 2 („MBD-Konstrukt“) an hypermethylierte CpG-Loci anlagert. Die spezifische Bindung des ersten Konstrukts wird über ein deadCas9-Protein vermittelt, welches einer Cas9 ohne Endonukleaseaktivität entspricht und demnach keine Änderungen im Genom verursacht [81]. Eine *single guide RNA* (sgRNA) formt mit dCas9 einen Komplex und bindet über Wasserstoffbrückenbildung an die entsprechend festgelegte DNA-Sequenz [82]. Die Bindungsspezifität wird durch die sgRNA-DNA-Interaktion determiniert, wobei bei der Auswahl der Zielsequenz auf eine Reduktion sogenannter *off-target* Effekte geachtet werden muss [81]. Das zweite Konstrukt bindet durch die *Methyl-Binding-Domain* (MBD) des MBD1-Proteins an symmetrisch methylierte CpG-Loci, wobei diese Bindung bevorzugt in Regionen mit hoher Dichte an methylierten CpG-Dinukleotiden erfolgt, beispielsweise in CpG-Inseln [83]. MBD-Proteine dienen in Zellen physiologisch der Rekrutierung expressionshemmender Proteine zur Verstärkung des *Gene Silencing* [63]. Die DNA-Bindekomponenten beider Konstrukte sind jeweils über ein Cage-Latch-Key-System mit dem N- bzw. C-Terminus des split-Inteins gp41-1 verbunden. Das Cage-Latch-Key-System reduziert unspezifische Interaktionen zwischen den split-Inteinen, indem es ein effektives Intein-Splicing erst nach Konformitätsänderung bei Vorliegen beider Konstrukte

in räumlicher Nähe ermöglicht [84]. Nach Öffnung des Cage-Latch-Elements rekonstituieren sich N- und C-Intein zu einem funktionellen Komplex, der durch posttranslationales Intein-Splicing unter Ligation der Exteine (hier: Key & Latch) freigesetzt wird [85]. An beide Intein-Termini ist jeweils ein Fragment der splitTEV-Protease (N-TEVp 3-70aa & C-TEVp 61-242aa) kovalent gebunden, welche nach Freisetzung des rekonstituierten splitTEVp-Intein-Komplexes katalytisch aktiv sind [86,87]. Die TEVp kann durch enzymatische Spaltung innerhalb ihrer Erkennungssequenz ENLYFQS weitere Effekte induzieren, beispielsweise die Aktivierung von Lumineszenzproteinen [87].

Um die Funktion des Reportersystems zu überprüfen, wurde eine induzierbare Luciferase (flipNluc) auf Basis der Nano Luciferase entwickelt, die durch Umsatz ihres Substrats Furimazin Lumineszenz mit $\lambda_{em} = 462$ nm emittiert [88–90]. Hierfür wurde in die Nluc zwischen *Large Bit* und *Small Bit* ein Flip-Mechanismus mit der TEV-Erkennungssequenz eingebracht, der vormals durch *Zhang et al.* für das Design der flipGFP genutzt wurde [80,91]. Im nicht-induzierten Zustand liegt der β -Strang des *Small Bit* in paralleler Ausrichtung vor, wodurch das aktive Zentrum der Nluc inaktiv ist. Sobald die TEV-Protease an der Erkennungssequenz schneidet, „flippt“ der β -Strang des *Small Bit* in die Nluc-typische antiparallele Konformation zurück und stellt somit das aktive Zentrum wieder her (vgl. **Abbildung 3 F**) [80]. Durch oxidative Decarboxylierung des Nluc-Substrats entsteht dann ein messbares Signal [89]. In unseren Vorarbeiten zeigte die flipNluc eine bis zu 40-fache Lumineszenzinduktion durch die TEV-Protease [80]. Der Flip-Mechanismus erhöht das Molekulargewicht von 19 kDa bei der Nluc auf etwa 32 kDa bei der flipNluc.

Das Reportersystem lässt sich demnach wie folgt zusammenfassend beschreiben: Befindet sich eine methylierte CpG-Insel in räumlicher Nähe zur definierten dCas9-Bindestelle, kommt es zu einer Konformationsänderung im Cage-Latch-Key-System, sodass die split-Inteine interagieren und einen rekonstituierten splitTEVp-Intein-Komplex freisetzen. Die TEV-Protease induziert dann durch Aktivierung der flipNluc Lumineszenz (vgl. **Abbildung 3**). Damit das System maligne von gesunden Zellen unterscheiden kann, müssen die CpG-Inseln in der Nähe der untersuchten dCas9-Binderegion bei KRK-Zellen hypermethyliert sein. Um keine physiologischen Zellen zu erkennen, sollten die CpG-Inseln dort möglichst vollständig unmethyliert sein, sodass die MBD nicht bindet. Die von unserer Arbeitsgruppe in Vorarbeiten durchgeführte Evaluation des Reportersystems anhand der hypermethylierten Gene *EN1* und *SCTR* zeigte eine statistisch signifikante Induktion, allerdings bei hohen unspezifischen

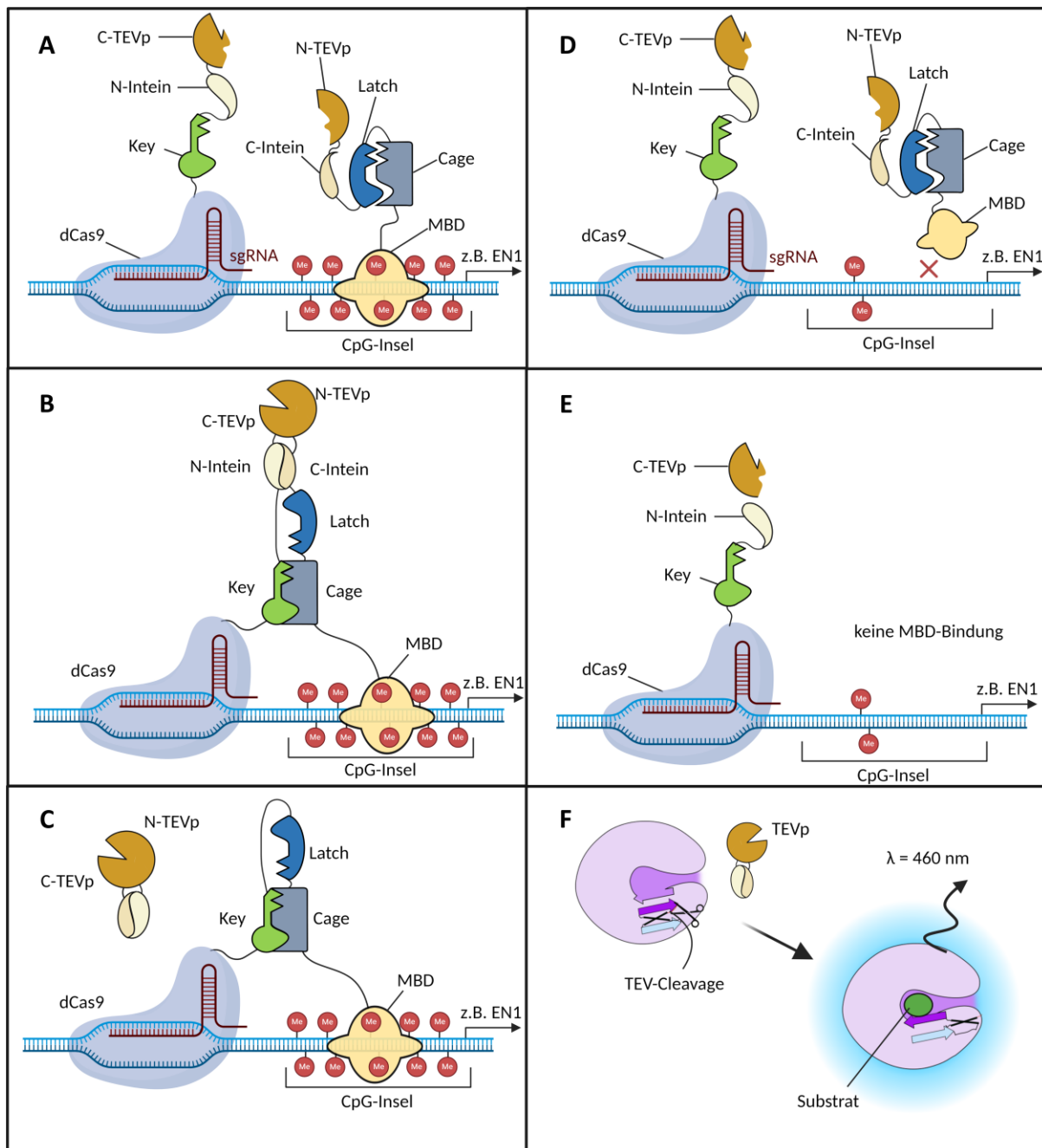


Abbildung 3: Reportersystem zur Detektion maligner Zellen anhand von Hypermethylierung. (A) Der Komplex aus dCas9 und Sequenz-spezifischer sgRNA lagert sich an die genomische Zielregion an, die in der Nähe einer beim KRK hypermethylierten CpG-Insel lokalisiert ist. Außerdem bindet das MBD-Konstrukt selektiv an methylierte CpG-Inseln. (B) Durch die Bindung beider Konstrukte in räumlicher Nähe resultiert die Öffnung des Cage-Latch-Systems durch Interaktion von Cage und Key. (C) Mittels Intein-Splicing wird der rekonstituierte splitTEVp-Intein-Komplex unter Ligation von Key und Cage freigesetzt. (D) In gesundem Gewebe liegt die CpG-Insel unmethyliert vor, weshalb das MBD-Konstrukt nicht effizient bindet und nur das dCas9-Konstrukt vorhanden ist. (E) Daher kommt es zu keiner Freisetzung des splitTEVp-Intein-Komplexes. (F) Die flipNluc wird durch die TEV-Protease geschnitten, sodass der β -Strang des *Small Bit* in die antiparallele Ausrichtung „flippt“ und die Luciferase aktiviert wird. Unter Substratumsatz kommt es zur Lumineszenzemission. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

Hintergrundsignalen der flipNluc [80]. Ziel dieser Dissertationsschrift und der weiteren Untersuchungen ist daher die Weiterentwicklung und Validierung des Reportersystems. Hierfür mussten vorhandene Konstrukte nach vorhergehenden Experimenten zur

Optimierung umgebaut und neu kloniert werden, um eine verbesserte Aktivierung des Luciferase-Reporters (flipNluc) zu erzielen. Zudem wurde das Reportersystem gezielt auf weitere, neue hypermethylierte Biomarker des KRK angepasst, was die Spezifität weiter erhöhen soll.

1.4 Analyse der Caspase-Aktivität im Verlauf der Apoptose

Ein weiterer Anwendungsfall für induzierbare Reporterproteine liegt in der Quantifizierung und Differenzierung zellulärer Signalwege. Bei der Apoptose handelt es sich um einen Prozess, der für die physiologische Zellregulierung und Differenzierung von zentraler Bedeutung ist [92]. Eine Dysregulation dieser Signalkaskade ist in der Entwicklung etlicher Erkrankungen wie bei Autoimmunkrankheiten sowie während der Karzinogenese von Bedeutung [93,94]. Außerdem wirken diverse Medikamente durch proapoptotische Signale zytotoxisch, sodass Methoden zur *real-time* Quantifizierung der Apoptose in der Wirkstoffforschung benötigt werden. Vor allem Chemotherapeutika führen durch DNA-Schädigung zum programmierten Zelltod und wirken dadurch tumorreduktiv [93].

Bei den sogenannten Caspasen handelt es sich um Proteasen, die durch ihre Aktivierung die Effekte der Apoptose vermitteln. Sie führen zur hydrolytischen Spaltung ihrer Substrate innerhalb der jeweiligen Erkennungssequenz nach Aspartatresten [94]. Je nach Auslöser wird hierbei zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptose-Signalweg unterschieden. Der intrinsische Weg wird durch die Bcl-2 Proteinfamilie reguliert und führt bei zellulärem Stress zur Freisetzung von Cytochrom C, das in Kombination mit dem Apoptose-auslösenden Faktor-1 (APAF1) das Apoptosom bildet und letztlich zur Aktivierung von Caspase-9 führt [93,95]. Caspase-9 aktiviert dann Effektor-Caspasen wie Caspase-3 [95]. Demgegenüber wird die extrinsische Apoptose durch Bindung externer Liganden (z. B. Fas-Ligand) an Rezeptoren der TNF-Familie vermittelt, was zur Aktivierung der Caspase-8 führt [93,95]. Über die Spaltung von Bid zu tBid durch Caspase-8 besteht zudem eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Pfad (vgl. **Abbildung 4**) [96–98]. Demnach kann es auch nach extrinsischer Apoptose-Induktion zur Zerstörung von Mitochondrien, einer Freisetzung von Cytochrom C und damit einhergehend einer Aktivierung von Caspase-9 kommen [98,99].

In dieser Arbeit soll durch Kombination mehrerer Reporterproteine, die durch die Proteasenaktivität der Caspasen induziert werden, ein System zur Differenzierung der Apoptosewege etabliert werden. Hierfür wird die TEV-Erkennungssequenz der flipNluc durch

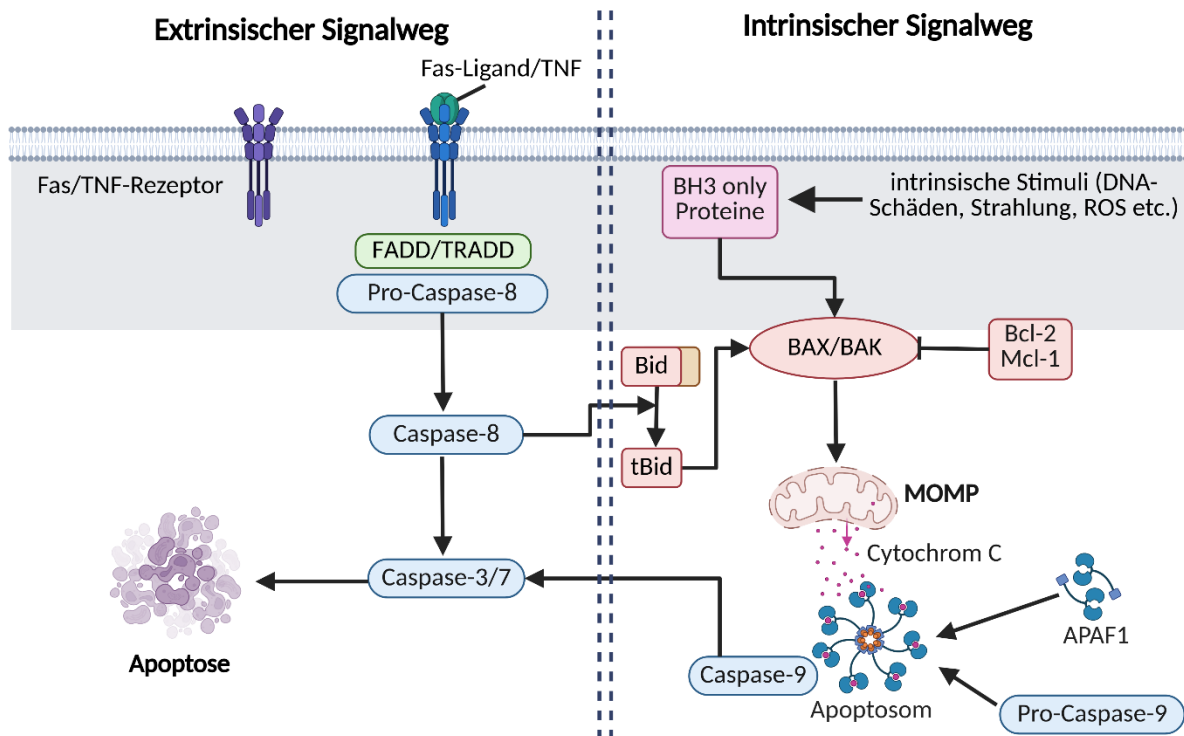


Abbildung 4: Extrinsische und intrinsische Apoptose. Die Apoptose dient als zentraler regulierender Signalweg für die Aufrechterhaltung einer physiologischen Zellhomöostase. Diese schematische Abbildung zeigt die Bedeutung der Caspase-8 für die extrinsische sowie der Caspase-9 für die intrinsische Apoptose. Die Effektor-Caspasen-3/7 stellen die gemeinsame Apoptose-Induktion beider Wege dar.

APAF1 = Apoptotic Protease Activating Factor 1; BAK = Bcl-2 Antagonist/Killer; BAX = Bcl-2-Associated X Protein; Bcl-2 = B-Cell Lymphoma 2; Bid = BH3 interacting-domain death agonist; FADD = Fas-Associated Death Domain Protein; Mcl-1 = Myeloid Cell Leukemia Sequence 1; MOMP = Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization; ROS = Reactive Oxygen Species; tBid = Truncated Bid; TRADD = TNFR-Associated Death Domain Protein. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

diejenige der jeweiligen Caspase ersetzt. Um drei Caspasen parallel zu detektieren, werden zwei zusätzliche Reporter benötigt. Zum einen kommt die induzierbare CP₂₃₄-Luc zum Einsatz (CPFluc). Sie wurde auf Basis der Firefly Luciferase von *Wigdal et al.* entwickelt und emittiert nach ihrer Aktivierung durch eine Protease unter Substratumsatz Lumineszenz mit $\lambda_{em}(Fluc) = 562 \text{ nm}$ [90,100]. Die Detektion der Caspase-3 erfolgt durch flip-mNG3A, eine modifizierte Variante des Fluoreszenzproteins mNeonGreen 3A, bei der analog zur flipNluc ein Flip-Mechanismus inseriert wurde [91,101]. Nach Anregung bei $\lambda_{ex} = 506 \text{ nm}$ kann für die aktivierte flip-mNG3A ein Signal bei $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$ gemessen werden [102]. Da sich die Erkennungssequenz (DEVDG) von Caspase-3 und Caspase-7 nicht unterscheidet, ist mit vorliegendem System keine Differenzierung dieser beiden Caspasen möglich [103]. Durch den Einsatz der drei Reporter, die spezifisch durch eine Caspase aktiviert werden und unter verschiedenen Bedingungen Signale emittieren, kann eine Unterscheidung der Caspasen erfolgen. Nachdem die beiden Luciferasen (flipNluc & CPFluc) eine unterschiedliche

Substratspezifität besitzen, entscheidet die Substratauswahl darüber, welches Signal gemessen wird. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren ist vermutlich auch die parallele Quantifizierung unter Einsatz entsprechender Emissionsfilter möglich. Die Fluoreszenz des flip-mNG3A wird ohnehin separat erfasst, da hierfür eine Anregung mit definierter Wellenlänge erfolgen muss.

Der Einsatz molekulargenetischer Caspasen-Sensoren zur Apoptose-Detektion in Echtzeit wird als vielversprechende Methode in der Grundlagenforschung und Medikamentenentwicklung angesehen [104].

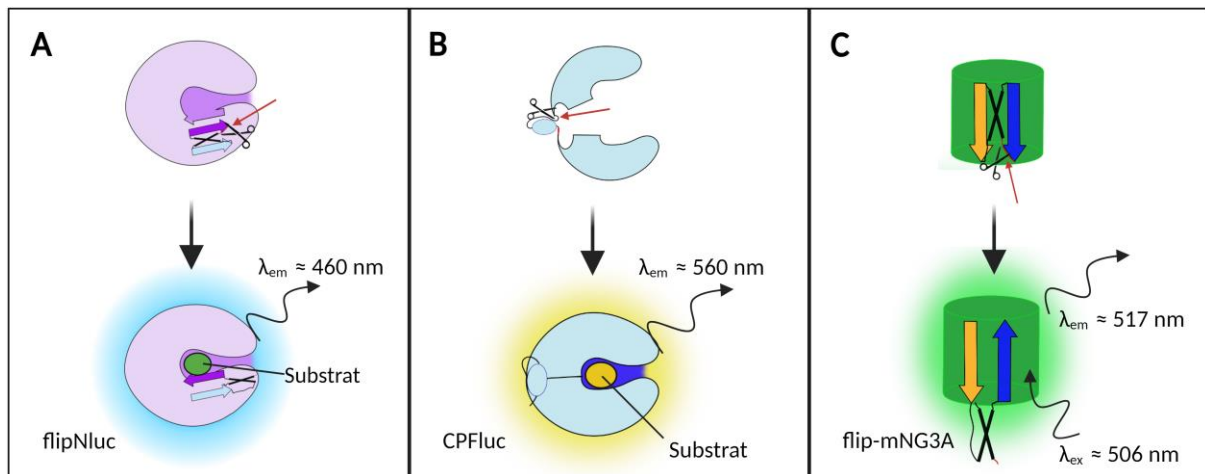


Abbildung 5: Reporterproteine des TCA. Die Regionen, in denen sich die charakteristischen Caspasen-Erkennungssequenzen befinden, sind jeweils durch das Scherensymbol und einen roten Pfeil markiert. Oben im Bild ist jeweils die inaktive, unten die aktive Form des Proteins abgebildet. **(A)** Die **flipNluc** besitzt innerhalb ihres Flip-Mechanismus eine spezifische Caspasen-Erkennungssequenz, welche durch aktive Caspasen gespalten wird. Dadurch kommt es zu einem "β-Strang-Flip", wodurch die flipNluc in ihre aktive Form überführt wird und bei vorhandenem Substrat Lumineszenz emittiert. **(B)** Die **CPFluc** basiert auf der CP234-Luc und befindet sich zunächst in der inaktiven (offenen) Konformation. Spaltet eine Caspase an ihrer entsprechenden Erkennungssequenz, geht die Luciferase in ihre aktive (geschlossene) Form über und kann unter Substratumsatz Lumineszenz emittieren. **(C)** Das Fluoreszenzprotein **flip-mNG3A** enthält analog zur flipNluc einen Flip-Mechanismus, der nach *Cleavage* der entsprechenden Caspasen-Erkennungssequenz zur Konformitätsänderung führt. Ein Fluoreszenzsignal kann nach Anregung detektiert werden. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit verfolgt zwei zentrale Ziele: Zum einen soll ein neuer Ansatz zur frühzeitigen Diagnose und potenziellen Therapie des KRK anhand epigenetischer Veränderungen etabliert werden. Durch die Identifikation neuer Biomarker könnten diagnostische Verfahren verbessert und damit sowohl *Screening*-Maßnahmen als auch gezielte Therapien optimiert werden. Langfristig könnte dies zur Senkung der Inzidenz und Mortalität des KRK beitragen [9,105].

Zudem wird ein Echtzeit-Reportersystem zur frühzeitigen Detektion der Apoptose entwickelt, das eine präzise Analyse relevanter Signalwege ermöglicht. Es basiert ebenso wie das Methylierungsreportersystem auf der flipNluc, wobei die Luciferase hierbei durch Caspasen anstelle der TEV-Protease aktiviert wird. Der Einsatz weiterer induzierbarer Caspasen-spezifischer Reporterproteine ermöglicht die Differenzierung verschiedener Apoptose-Signalwege. Somit entsteht ein neues Werkzeug zur Analyse von Wirkmechanismen unterschiedlicher therapeutischer Substanzen im Kontext des programmierten Zelltods.

Beide in dieser Dissertation verfolgten Ansätze tragen zur Weiterentwicklung sensitiver Diagnostik- und Analysesysteme bei, die sowohl für die frühzeitige Diagnostik kolorektaler Karzinome als auch für die Wirkstoffentwicklung von Relevanz sind.

Ansatz 1: Etablierung eines Reportersystems zur Detektion hypermethylierter CpG-Inseln

- Etablierung eines neuartigen Reportersystems basierend auf einer durch die TEV-Protease induzierbaren Luciferase zur Detektion hypermethylierter CpG-Inseln. Hierfür wird ein dCas9-Konstrukt kloniert, welches gezielt an Genloci bindet, sowie ein weiteres Konstrukt, das sich selektiv an methylierte CpG-Loci anlagert.
- Vergleich der Methylierungsmuster maligner Zellen mit gesundem Gewebe unter Verwendung von Krebszelllinien, Organoiden sowie primärer Patientenproben aus Kolonbiopsien.
- Analyse charakteristischer differenzieller Methylierung zur Identifikation neuer diagnostischer Biomarker-Kandidaten.
- Auswahl geeigneter sgRNAs zur gezielten Detektion dieser Regionen bei gleichzeitiger Minimierung potenzieller *off-target* Effekte.
- Optimierung des splitTEVp-Konstrukts zur verbesserten flipNluc-Induktion, um das Hintergrundsignal zu reduzieren und die Sensitivität zu erhöhen.

Ansatz 2: Echtzeit-Detektion der Apoptose-Induktion

- Entwicklung eines Reportersystems zur parallelen, *real-time* Aktivitätsbestimmung der Caspasen-3, -8 und -9, um apoptotische Signalwege zu analysieren. Hierfür erfolgt die Klonierung spezifischer Caspase-Schnittstellen in induzierbare Reporterproteine.
- Evaluation der Reporterproteine, sowohl einzeln als auch in Kombination.
- Stabile Integration des *Triple Caspase Assays* in die Zelllinie HCT116 mittels lentiviraler Transduktion zur langfristigen Nutzung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Verwendete technische Geräte

Produkt	Hersteller
Analysewaage XA105 Dual Range	Mettler-Toledo, Schweiz
Axiovert 25 C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Bioanalyzer Agilent 2100	Agilent Technologies Inc., USA
Biometra® Trio Kombi	Analytik Jena GmbH & Co KG, Deutschland
Certomat® H Inkubationshaube	Satorius AG, Deutschland
Certomat® R Schüttler	Satorius AG, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
CO ₂ -Inkubator	Binder Inc., USA
Covaris Instrument S2	Covaris, USA
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Deutschland
Elektrophorese Netzteil EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech Inc., UK
Elektrophorese Netzteil EV 261	Consort bvba, Belgien
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Elektrophoresekammer Multigel	Biometra GmbH, Deutschland
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Gene Pulser® 2, Gene Pulser® 2 RF Module, Pulse Controller Plus	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
HERAsafe® KS 12 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, USA
KS260 Basic Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Deutschland
Laborwaage L2200P	Sartorius AG, Deutschland
LG100-UV-G Quartz Küvette	Implen GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 Real-time PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Panasonic, Japan
MS2 S8 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG, Deutschland
MTS 2/4 digital Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Deutschland
Multipette M4	Eppendorf AG, Deutschland
NanoPhotometer	Implen GmbH, Deutschland
NextSeq 550 System	Illumina, USA
pH-Meter SevenCompact™ / Ion S220	Mettler-Toledo, Schweiz
Qubit™ 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, USA
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Deutschland
TC20™ automatischer Zellzähler	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
TE77XP Semi-Dry Transfergerät	Hoefer Inc., USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
TriStar ² LB 942 Multimode Reader	Berthold Technologies, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
VOYAGER II 12-Kanal 12,5 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
VOYAGER II 8-Kanal 50 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Q-POD	Merck Millipore, USA
Wasserbad, beheizbar	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge, myFUGE mini	Benchmark Scientific Inc., USA
Zentrifuge, Pico 17	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge, Sorvall® RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
ZOE Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad Laboratories Inc., USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
96-Well Platten (weiß & schwarz, klarer Boden)	Berthold Technologies, Deutschland
Aspirationspipette 2 ml	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
costar® 6-Well, 12-Well, 24-Well Zellkulturplatte	Corning, USA
costar® Stripette® 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, USA
CryoTube®	Thermo Fisher Scientific, USA
DNA-Chips 1000	Agilent Technologies Inc., USA
DNA-Chips High Sensitivity	Agilent Technologies Inc., USA
Drigalskispatel Delta™ HS8151	Sigma Aldrich, USA
Elektroporationsküvetten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Falcon Tube 14 ml, 15 ml, 50 ml	Corning, USA
gestopfte Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	nerbe plus GmbH & Co KG, Deutschland
GripTip Filter 12,5 µl, 125 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Light Cycler 480, 384-Well Platte	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler 480, Sealing Folie	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Millex® Sterilfilter 0,2 µm PTFE-Membran	Merck Millipore, USA
Mini PROTEAN TGX-Gel (4-20% Gradient, 10 Wells)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
PCR-Tubes 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Deutschland
Pipettierreservoirs 10 ml, 25 ml	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Safe-Lock Eppendorf-Tubes 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Slide-A-Lyzer Dialysiereinheit 3.500 MWCO	Thermo Fisher Scientific, USA
Sterilfilter Vakuumfiltration 0,22 µm, PES-Membran	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Whatman-Paper 3MM	GE Healthcare, USA
Zählkammern für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Zellkultur TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
Zellkulturflasche T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien & sonstige Reagenzien.

Produkt	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore, USA
10x Re-Blot Plus Strong Stripping Lösung	Merck Millipore, USA
10x RIPA Lysepuffer	Merck Millipore, USA
10x TBS Lösung	Merck Millipore, USA
1x DMEM	Life Technologies Limited, USA
1x DPBS	Sigma Aldrich, USA
1x TE Puffer, pH 8,0	AppliChem GmbH, Deutschland
20% SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
2-Propanol, ≥ 99,8%	Sigma Aldrich, USA
2x Pierce™ Luciferase Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, USA
6x Lämmli SDS Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Accutase®	Sigma Aldrich, USA
Aminocapronsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
anti-polyHistidin, His Tag Antikörper (AD1.1.10)	R&D Systems, USA
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Mastermix	Agilent Technologies Inc., USA
Carbenicillin Dinatriumsalz ≥88%	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Cas9 Antikörper (7A9-3A3)	Active Motif, USA
cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
D-(+)-Glucose, MW 180,6	Sigma Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
D-Luciferin-Ethylester (ab275489)	Abcam, UK
Essigsäure, Rotipuran 100%	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Ethanol, ≥ 99,8%	Sigma Aldrich, USA
fetales Kälberserum	Bio&Sell, Deutschland
Formaldehyd 16% w/v, Methanol-frei	Thermo Fisher Scientific, USA
Gel Loading Dye, Purple 6x	New England Biolabs, USA
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder 0,1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Thermo Fisher Scientific, USA
Gibco OptiMem™ Medium	Thermo Fischer Scientific, USA
Glycerin, Rotipuran® ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller), granuliert	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller), granuliert	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Lenti-X™ Concentrator	Takara Bio USA Inc., USA
Luminol Natriumsalz	Merck Millipore, USA
Magermilchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
McCoy's 5A	Sigma Aldrich, USA
Methanol, ≥99,9%, Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Nano-Glo® Endurazin™	Promega, USA
Natronlauge 1 M	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
NEB® 10-beta/Stable Outgrowth Medium	New England Biolabs, USA
NEBNext® Sample Purification Beads	New England Biolabs, USA
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs, USA
nukleasefreies Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland

PageRuler™ Plus 10 – 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Panobinostat (LBH589)	Selleck Chemicals GmbH, Deutschland
p-Cumarsäure	Merck Millipore, USA
Penicillin ($10.000 \frac{\text{IE}}{\text{ml}}$) – Streptomycin ($10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)	Sigma Aldrich, USA
PhosSTOP™	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Puromycin ($10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)	InvivoGen, USA
Q5® Hot Start High-Fidelity Master Mix	New England Biolabs, USA
rCutSmart™ Puffer	New England Biolabs, USA
Restriktionsenzyme ➤ Avr2 ➤ BamH1-HF® ➤ EcoR1-HF® ➤ Mlu1-HF® ➤ Pac1 ➤ Sal1-HF® ➤ Xba1	New England Biolabs, USA
rhFas-Ligand	R&D Systems, USA
rhTNF-α	R&D Systems, USA
Salzsäure 1 M	Sigma Aldrich, USA
SOB-Medium	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Staurosporin (AM-2282)	Selleck Chemicals GmbH, Deutschland
SYBR™ Safe	Thermo Fisher Scientific, USA
TRIS ($M = 121,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$)	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Tween® 20	Merck Millipore, USA
UltraPure™ 0,5 M EDTA, pH 8,0	Thermo Fisher Scientific, USA
Venetoclax (ABT-199)	Selleck Chemicals GmbH, Deutschland
Wasserstoffperoxid, Rotipuran 30%	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
X-tremeGENE™ HP DNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Produkt	Hersteller
DNA 1000 Reagenzien	Agilent Technologies Inc., USA
DNA High Sensitivity Reagenzien	Agilent Technologies Inc., USA
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, USA
Nano-Glo® Live Cell Assay System	Promega, USA
NEBNext® Enzymatic Methyl-seq Kit	New England Biolabs, USA
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles)	Illumina, USA
Pierce™ Magnetic ChIP	Thermo Fisher Scientific, USA
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Qubit™ dsDNA HS-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.5 Bakterien, Zellen und Organoide

Tabelle 5: Bakterien, Zellen & gekaufte Organoide.

Produkt	Hersteller
3dGRO™ human iPSC Derived Colon Organoids	Merck Millipore, USA
Caco-2 [Caco2] (ATCC HTB-37)	ATCC, USA
HCM-SANG-0269-C18 (ATCC PDM-46)	ATCC, USA
HCT 116 (ATCC CCL-247)	ATCC, USA
HEK 293T (ATCC CRL-3216)	ATCC, USA
NEB® 10-beta Competent E. coli	New England Biolabs, USA
NEB® 10-beta Electrocompetent E. coli	New England Biolabs, USA
NEB® Turbo Electrocompetent E. coli	New England Biolabs, USA

2.1.6 Software und Tools

Tabelle 6: Verwendete Software & Tools.

Name	Entwickler	Referenz
annotatr v1.24.0	Cavalcante & Sartor	[106,107]
Biorender.com	Biorender, Kanada	
Bismark v0.22.3	Babraham Institute, UK	[108]
CRISPOR	TEFOR Paris-Saclay, Frankreich	[109]
Cutadapt v4.1	National Bioinformatics Infrastructure, Schweden	[110]
DSS v2.46.0	Wu & Feng	[111,112]
Excel, PowerPoint, Word 365	Microsoft, USA	
FastQC v0.11.9	Babraham Institute, UK	[113]
Geneious Prime v2023.0.4	Dotmatics, USA	
GraphPad Prism v8.0.1	GraphPad Software Inc., USA	
ICE Software Multimode Reader	Berthold Technologies GmbH & Co KG, Deutschland	
Image Lab v6.0.1	Bio-Rad Laboratories Inc., USA	
Inkscape	---	
LightCycler 480 Software, v1.5 SP4	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland	
Python v3.10.6	Python Software Foundation, USA	
RStudio	Posit PBC, USA	
Seqmonk v1.48.1	Babraham Institute, UK	
Tm Calculator	New England Biolabs, USA	
Trim Galore! v0.6.7	Babraham Institute, UK	[114]

2.1.7 Zusammensetzung der Puffer und Zellkulturmedien

50x TAE-Puffer	242 g Tris
	100 ml EDTA (0,5 M)
	57,1 ml Essigsäure
	auf 1.000 ml mit Millipore-Wasser auffüllen

1x TAE-Puffer	200 ml 50x TAE-Puffer auf 10 L mit Millipore-Wasser auffüllen
1x TBS-T-Puffer	100 ml 10x TBS 900 ml Millipore-Wasser 0,5 ml Tween® 20
Anodenpuffer A	18,2 g TRIS 100 ml Methanol auf 500 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
Anodenpuffer B	1,5 g TRIS 100 ml Methanol auf 500 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
Blocking-Puffer	100 ml 1x TBS-T Puffer 5 g Magermilchpulver
ECL-Lösung	1 ml Luminol (250 mM, in DMSO gelöst) 440 µl p-Cumarsäure (90 mM, in DMSO gelöst) 10 ml TRIS (1 M) auf 100 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
Einfriermedium	McCoy's 5A bzw. DMEM 20 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
HCT116-Kulturmedium	500 ml McCoy's 5A Medium 50 ml fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration: $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
HEK293T-Kulturmedium	500 ml DMEM-Medium 50 ml fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration: $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
Kathodenpuffer C	1,5 g TRIS 100 ml Methanol 2,6 g Aminocapronsäure auf 500 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
LB-Medium	25 g LB-Medium (Luria/Miller) auf 1.000 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
LB-Selektionsagarplatten	20 g LB-Agar (Luria/Miller), granuliert 1 ml Carbenicillin ($c_{\text{Stock}} = 50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) auf 500 ml mit Millipore-Wasser auffüllen

RIPA-Puffer	10 ml RIPA-Puffer 1 Tablette PhosSTOP 1 Tablette cOmplete Mini EDTA-freier Proteaseinhibitor
SDS-Puffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 5 ml SDS (20 %) auf 1.000 ml mit Millipore-Wasser auffüllen
SOC-Medium	26,64 g SOB-Medium auf 1.000 ml mit Millipore-Wasser auffüllen

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

HCT116 Wildtyp (WT), HEK293T sowie genetisch modifizierte Zellen werden in Nährmedium bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Bei ca. 80 % Konfluenz werden sie unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierfür werden die Zellen nach Absaugen des überstehenden Mediums durch Zugabe von 7 ml 1x DPBS gewaschen, um Überreste abgestorbener Zellen zu entfernen. Die Zellen werden anschließend mit 3 ml Accutase vom Boden der Flaschen gelöst. Für den Stopp der enzymatischen Reaktion wird 7 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Eine Fraktion dieser Zellsuspension wird in eine frische T75-Kulturflasche überführt und mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Übrige Zellen werden entweder für nachfolgende Experimente ausgesät oder verworfen.

Für die Zelllinie HCT116 wird das Nährmedium McCoy's 5A verwendet, während für HEK293T DMEM genutzt wird. Die genaue Zusammensetzung der Kulturmedien ist in Abschnitt 2.1.7 aufgeführt. Fetales Kälberserum wird vor Zugabe zum Medium im Wasserbad für 30 min auf 56 °C erhitzt, um ungewünschte Komplementsysteme zu denaturieren. Vor Therapieinduktion, Passagieren oder Aussaat erfolgt eine durchlichtmikroskopische Beurteilung der Zellen.

2.2.2 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zur Langzeitlagerung werden die adhärenenten Zellen analog zum Passagieren vom Flaschenboden abgelöst, in 8 ml Nährmedium aufgenommen und in ein 15 ml Gefäß gegeben. Die Zellsuspension wird für 3 min bei 300 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das

Zellpellet in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese wird dann in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots werden zunächst über 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Dort gelagerte Zellen werden unmittelbar nach Entnahme aus der Kühlung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Gefäß mit 3 ml Nährmedium überführt. Nach der 3-minütigen Zentrifugation bei $300 \times g$ wird der Überstand verworfen, das mit 4 ml Medium resuspendierte Zellpellet in eine T25-Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

2.2.3 Aussäen von Zellen

Für die Zellaussaat wird die im Zuge des Passagierens verbleibende Zellsuspension verwendet. Diese wird zunächst in ein 50 ml Falcon überführt und deren Konzentration $\left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right]$ mithilfe des automatischen Zellzählers bestimmt. Hierfür werden $20\ \mu\text{l}$ entnommen und vorsichtig im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau zur Unterscheidung toter und lebendiger Zellen vermischt. Basierend auf dem Mittelwert zweier Messungen der Anzahl lebender Zellen wird die Suspension auf eine Konzentration von $2 \times 10^5 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ verdünnt. Pro Well erfolgt die Aussaat auf einer 96-Well Platte mit 20.000 Zellen in $100\ \mu\text{l}$, auf einer 48-Well Platte mit 75.000 Zellen in $500\ \mu\text{l}$, auf einer 24-Well Platte mit 1×10^5 Zellen in 1 ml und auf einer 6-Well Platte mit 4×10^5 Zellen in 3 ml. In eine Zellkulturschale TC100 werden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 5 ml Medium ausgesät. Anschließend werden Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert, bevor sie weiterverwendet werden.

2.2.4 Transiente Transfektion von Plasmiden (Lipofektion)

Plasmide werden durch Lipofektion in ausgesäte Zellen eingebracht. Hierfür wird zunächst die DNA-Stammlösung mit sterilem Nuklease-freiem Wasser auf $100 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ verdünnt und das Lipofektionsmittel X-tremeGENE HP auf Raumtemperatur erwärmt. Für jede Vertiefung einer 96-Well Platte, in der eine Lipofektion erfolgen soll, wird $1\ \mu\text{l}$ verdünnte Plasmidlösung ($0,1\ \mu\text{g}$ DNA entsprechend) mit $9\ \mu\text{l}$ OptiMEM gemischt. Nachfolgend wird pro $1\ \mu\text{g}$ DNA das Lipofektionsreagenz im Verhältnis 3:1 zugegeben und nach Durchmischung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich mit DNA gefüllte Liposomen bilden können. Hiervon wird $10\ \mu\text{l}$ pro Well auf das bereits enthaltene Nährmedium gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Transfektion auf 6-Well Platten erfolgt analog unter Einsatz von $1\ \mu\text{g}$

DNA pro Well. In den Zellkulturschalen TC100 werden 100 µg DNA eingesetzt. Nach Inkubation der Platten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wird für optimales Zellwachstum und Plasmidexpression ein Nährmedienwechsel durchgeführt. 48 h nach Lipofektion werden die Zellen für nachfolgende Experimente verwendet.

2.2.5 Apoptose-Induktion in HCT116 Zellen

Die Apoptose-Induktion von Zellen auf 96-Well Platten erfolgt 48 h nach Plasmidtransfektion. Bei Durchführung des *Triple Caspase Assays* (TCA) werden Reportersignale vor Therapieinduktion zum Zeitpunkt $t = 0$ h gemessen (vgl. Kapitel 2.4). Zur primären Induktion der Caspase-3 wird Staurosporin, zur Aktivierung von Caspase-8 der Fas-Ligand in Kombination mit Anti-polyHistidin verwendet. Caspase-9 wird durch Panobinostat oder Venetoclax (ABT-199) induziert. Zusätzlich wird eine Kontrollbedingung angesetzt, bei der keine Wirkstoffzugabe erfolgt. Zwischen einzelnen Messzeitpunkten werden die Platten weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.6 Herstellung von Lentiviren

Für die Produktion von Lentiviren werden $2,1 \times 10^6$ HEK293T Zellen in einer Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät und ca. 24 h bis zu einer Konfluenz von 70 % bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgt die Lipofektion des kombinierten TCA-Konstrukts als Donor-Plasmid (vgl. **Anhang 1**) zusammen mit den lentiviralen Verpackungsplasmiden *pVSVG*, *pRSV-Rev* und *pMDLg* im Verhältnis 4:1:3:3 (DNA-Menge in µg).

Die Ernte produzierter Lentiviren erfolgt 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion. Hierzu wird unter S2-Bedingungen das virenhaltige Medium in ein 15 ml Gefäß überführt und für 10 min bei $500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird in einem frischen Gefäß mit dem Lenti-X Konzentrator im Verhältnis 3:1 vermischt und nach mehrfachem Invertieren für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch 45 min bei $1.500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 400 µl DMEM resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf Trockeneis eingefroren. Viren werden bei –80 °C gelagert und lediglich für die Transduktion aufgetaut. Nach allen Arbeitsschritten wird entstandener Abfall in der Sicherheitsbank für 1 h mit UV-Licht bestrahlt und anschließend autoklaviert.

2.2.7 Transduktion

Für einen stabilen Knock-In werden HCT116 WT Zellen auf 6-Well Platten ausgesät und für ca. 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70 % werden in jedes Well 200 µl einer zuvor auf Eis aufgetaute Virensuspension hinzugegeben. Nach weiterer Inkubation über 3 Tage im Brutschrank wird der Überstand abgenommen und durch ein Selektionsnährmedium, versetzt mit Puromycin, ersetzt. Die initiale Puromycindosis liegt bei 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und wird bei jedem Medienwechsel (2x wöchentlich) in 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ -Schritten bis auf 25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ gesteigert. Nach zwei Wochen werden noch lebende Zellen isoliert und separat auf 96-Well Platten ausgesät. Hierfür werden sie mit Accutase vom Boden der 6-Well Platte abgelöst und in Nährmedium aufgenommen. Von der mit Nährmedium auf 5 $\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ verdünnten Zellsuspension werden 100 µl in jede Vertiefung der 96-Well Platten gegeben (0,5 $\frac{\text{Zellen}}{\text{Well}}$). Nach Wachstum der Kolonien über eine Woche im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ werden weitere 100 µl Nährmedium zugegeben. Nach Erreichen einer ca. 60 %-igen Konfluenz werden die Zellen für weiteres Wachstum auf eine 48-Well Platte überführt. Analog hierzu werden die monoklonalisierten Zellen auf 24-Well Platten transferiert.

Die Genotypisierung erfolgt mit extrahierter DNA (vgl. Kapitel 2.7.1) mithilfe einer PCR, wodurch die integrierte genomische Sequenz mit flankierenden Primern amplifiziert wird. Das entstandene Fragment (4.003 bp) kann mittels Gelelektrophorese analytisch nachgewiesen werden. Anschließend wird das extrahierte PCR-Amplikon sequenziert. Die Genexpression einzelner Reporter wird zudem mit einem Western-Blot nachgewiesen: CPFluc (anti c-Myc-Tag), flipNluc (anti OLLAS-Tag) & flip-mNG3A (anti-VSV-G-Tag).

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Erstellen von Primern und Genfragmenten

Genfragmente in Form von gBlocks werden ebenso wie die mit *Geneious Prime* entworfenen Primer von Integrated DNA Technologies (IDT, Belgien) bezogen. Die Primer in Form eines Lyophilisats werden zunächst zentrifugiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM gebracht. Analog werden gBlocks auf 10 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ gebracht und mittels Vortexer aufgelöst. Nach erneutem Zentrifugieren werden sowohl gelöste Primer als auch

gBlocks im Thermomixer für 10 min bei 65 °C und 400 x rpm inkubiert. Die Lagerung erfolgt bei –20 °C.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird als 50 µl Ansatz mit 25 µl des DNA Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix, 5 µl eines Primer-Mix, 19 µl Nuklease-freiem Wasser und 1 µl Template-DNA ($1 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$) durchgeführt. Der Primer-Mix wird aus je 1 µl Forward- & Reverse-Primer sowie 18 µl Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Bei Verwendung genomischer DNA als Template werden 500 ng als Material in die PCR eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm des Thermocyclers findet sich in **Tabelle 7**. Die Annealing-Temperatur wird mithilfe des Tm Calculator (New England Biolabs, USA) berechnet, die Elongationszeit entspricht $\frac{\text{Länge Fragment [bp]}}{1.000 \text{ bp}} \times 30 \text{ s} + 15 \text{ s}$. PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese in 1 % Agarose aufgetrennt und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert (vgl. Kapitel 2.3.6 & 2.3.7).

Tabelle 7: Verwendete Standardeinstellungen für die PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	15 s	35 Zyklen
Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	variabel	
finale Elongation	72 °C	4 min	

2.3.3 Overlap-PCR

Um mehrere amplifizierte Fragmente zu verbinden, wird eine Overlap-PCR durchgeführt. Hierfür werden zunächst äquimolare Mengen aufgereinigter PCR-Produkte zu 25 µl DNA Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 48 µl aufgefüllt. Es folgt das erste Programm im Thermocycler, das bis auf eine angepasste Zykluszahl von 15 Wiederholungen analog zu **Tabelle 7** ist. Nach Zugabe von jeweils 1 µl einer 1:2 Verdünnung der Primer, die das gewünschte Overlap-PCR-Produkt flankieren, folgt das zweite Thermocycler-Programm. In diesem werden 30 Zyklen durchgeführt. PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese in 1 % Agarose aufgetrennt und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits extrahiert.

2.3.4 Plasmide und Restriktionsverdau

Die Plasmide enthalten einen CAG-Promotor zur Expression der kodierten Proteine sowie ein Resistenzgen für Ampicillin. Sie basieren auf dem *pCAGGS*-Vektor. Zur Transkription der sgRNA wird ein U6 Promotor verwendet. Zur Durchführung eines Restriktionsverdaus von Plasmiden wird 2-3 µg Plasmid-DNA in 4 µl rCutSmart-Puffer mit 1 µl der verwendeten Restriktionsenzyme verdaut. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wird durch Nuklease-freies Wasser auf 40 µl gebracht. Die Inkubation folgt im Thermomixer für mindestens 1 h gemäß dem Herstellerprotokoll der Enzyme. Anschließend werden die Fragmente im Rahmen einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits extrahiert. Abschließend wird die Konzentration mithilfe des Nano-Photometers bestimmt. Die Produkte des Restriktionsverdaus werden bei –20 °C gelagert.

2.3.5 Assemblierung von Plasmiden mittels Gibson Assembly

DNA-Fragmente mit entsprechenden Überlappungen werden durch die Gibson Assembly zusammengeführt. Hierfür werden gemäß dem Herstellerprotokoll äquimolare Mengen der Fragmente auf Eis zu 10 µl HiFi DNA Assembly Master Mix gegeben. Der Ansatz wird mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und für 60 min bei 50 °C im Thermocycler inkubiert. Das resultierende Produkt wird entweder unmittelbar weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert. Vor Transformation in elektrokompente *E. coli* Bakterien werden 7 µl des assemblierten Produkts für 10 min mit destilliertem Wasser dialysiert.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Ein 1 %-Agarosegel wird aus Agarosepulver in 1x TAE-Puffer hergestellt und mit SYBR-Safe als DNA-Färbemittel im Verhältnis 1:15.000 versetzt. Die Proben werden mit 6x Gel Loading Dye im Verhältnis 1:6 gemischt, um das Gel zu beladen. Zusätzlich werden bei jedem Gel 6 µl des GeneRuler 1 kb als DNA-Referenz in die erste Tasche gegeben. Für einen analytischen Lauf werden für 60 min 400 mA bei einer Spannung von 120 V angelegt, während für einen quantitativen Lauf 100 V über 80 min verwendet werden. Die Banden enthaltener DNA-Fragmente werden anschließend mittels ChemiDoc XRS+ abgebildet. Um DNA zu extrahieren,

werden die entsprechenden Banden aus dem Gel mechanisch ausgeschnitten und aufgereinigt (vgl. Kapitel 2.3.7).

2.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die DNA-Extraktion aus zuvor ausgeschnittenem Agarosegel erfolgt mittels QIAquick Gel Extraction Kit. Abweichend vom Herstellerprotokoll wird lediglich 35 µl Nuklease-freies Wasser zur Elution der DNA verwendet. Ferner wird das Auslösen der DNA aus der Spin Column durch Inkubation bei 37 °C für 3 min im Thermomixer maximiert. Abschließend wird die DNA-Konzentration mithilfe des Nano-Photometers bestimmt und die extrahierte DNA bei –20 °C gelagert.

2.3.8 Transformation von Plasmiden in Bakterien und Bakterienkultur

Zusammengesetzte Plasmide mit einer Größe > 10 kb werden in chemokompetente, kleinere Plasmide (< 10 kb) in elektrokompente E. coli gemäß dem jeweiligen Herstellerprotokoll transformiert. Alle verwendeten Plasmide enthalten eine Ampicillin-Resistenzkassette. Vor der Transformation in elektrokompente Bakterien wird die DNA zunächst für 10 min dialysiert. Anschließend werden 5 µl hiervon zu 50 µl der zuvor auf Eis aufgetauten elektrokompenten E. coli gegeben und in gekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm) transferiert. Nach Abgabe eines 2,5 kV Pulses (25 µF) wird die Bakteriensuspension unmittelbar in 950 µl vorgewärmtes SOC-Medium (37 °C) überführt und im Thermomixer bei 37 °C und 300 rpm für 1 h inkubiert. Die Transformation von Plasmiden in 10-beta chemokompente E. coli erfolgt durch Zugabe von 5 µl des assemblierten Plasmids zu 50 µl Bakterien. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgt ein Hitzeschock bei 42 °C über 30 s und unmittelbar danach eine Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Zugabe von 950 µl vorgewärmtem 10-beta Wachstumsmedium (37 °C) wird die Bakteriensuspension ebenfalls über 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert.

Sowohl chemo- als auch elektrokompente Bakterien werden auf LB-Selektionsagarplatten ausgestrichen und anschließend für mindestens 12 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Agarplatten enthalten Carbenicillin mit einer Endkonzentration von $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ zur Selektion der Bakterien, die durch erfolgreiche Plasmid-Transformation antibiotikaresistent geworden sind.

2.3.9 Plasmidpräparation aus Bakterien und Sequenzierung

Sobald Bakterienkolonien auf den inkubierten Agarplatten sichtbar sind, werden einzelne Kolonien mit sterilen 10 µl Pipettenspitzen aufgenommen und in ein 14 ml Falcon überführt. Hierzu werden 3 ml LB₀-Medium, versetzt mit Carbenicillin ($100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$), zugegeben. Die Inkubation der Röhrchen erfolgt im Schüttler für 6 h bei 37 °C und 200 rpm. Anschließend wird aus 2 ml Bakteriensuspension die Plasmid-DNA mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Validierung der Plasmid-Sequenzen erfolgt durch *Sanger Sequencing* (Eurofins) mit geeigneten Primern.

Nach Kontrolle der Sequenzen werden 200 µl der entsprechenden Bakteriensuspension zu 200 ml LB₀-Medium mit Carbenicillin ($100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) gegeben. Es folgt die Inkubation über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler. Die Plasmid-Extraktion wird mithilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Aufgereinigte DNA-Pellets werden mit Nuklease-freiem Wasser gelöst. Zur optimalen Resuspension der DNA erfolgt eine Inkubation bei 65 °C und 300 rpm über 1 h im Thermomixer. Neben der photometrischen Bestimmung der Plasmid-Konzentration wird die Reinheit des gewonnenen Produkts anhand der Absorptionskoeffizienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} überprüft. Die DNA wird bei –20 °C gelagert.

2.4 Quantifizierung von Fluoreszenz und Lumineszenz

Messungen von Fluoreszenz und Lumineszenz im Rahmen der Echtzeit-Detektion der Caspasen-Reporter erfolgen auf 96-Well Platten mit durchsichtigem Boden. Verwendete Luciferasen setzen spezifische Substrate zur Emission der Lumineszenz um. Für die Nano Luciferase (Nluc) wird das zellmembranpermeable Endurazin eingesetzt, während für die Firefly Luciferase (Fluc) ebenfalls zellmembranpermeables D-Luciferinethylester verwendet wird. Zunächst wird der Überstand einzelner Wells verworfen und anschließend durch 100 µl einer Mischung aus Zellmedium und jeweiligem Substrat ersetzt. Endurazin wird im Verhältnis 1:100 eingesetzt, während D-Luciferinethylester in einer Endkonzentration von 100 µM vorliegt. Nach 20 min Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Internalisierung der Substrate werden die Signale bei $t = 0$ h gemessen, was primär der Berechnung von Normalisierungsfaktoren dient. Vor Apoptose-Induktion wird der Überstand erneut verworfen und durch ein Gemisch aus Nährmedium, Substraten in oben genannter

Konzentration sowie entsprechender Wirkstoffe ersetzt. Die Platten werden zwischen einzelnen Messungen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Da im Rahmen des *Triple Caspase Assays* Nluc und Fluc parallel in einem Well gemessen werden, werden sowohl Endurazin als auch D-Luciferinethylester in obiger Konzentration zugegeben. Um die Konzentration aufrechtzuerhalten, wird alle 12 h frisches D-Luciferinethylester zugegeben. Die Messung des Methylierungsreportersystems erfolgt entweder mittels Nano Glo Live Cell Assay gemäß den Herstellerangaben oder mit Endurazin.

Alle Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen werden mit dem TriStar² LB 942 Multimode Reader durchgeführt. Bei Quantifizierung einer Luciferase allein wird kein Emissionsfilter verwendet, bei parallelen Messungen wird für Nluc der Filter F460 und für Fluc 560/10 genutzt. Die Fluoreszenzproteine mNG & flipEGFP werden mit Licht angeregt, das durch die Filter 500/10 (mNG) bzw. F485 (flipEGFP) geleitet wird. Die Messung erfolgt mittels der Emissionsfilter F535 (mNG) bzw. CT520/10 (flipEGFP). flip-mNG3A sowie mNG3A werden analog zu mNG detektiert.

2.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Bindung zwischen dCas9 und DNA wird durch eine Chromatin-Immunopräzipitation detektiert, die mit dem Pierce Magnetic ChIP Kit durchgeführt wird. HCT116 Zellen werden in TC100-Schalen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und zunächst für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die ChIP wird gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für das *Crosslinking* wird dem Nährmedium der Zellen Methanol-freies Formaldehyd für eine Endkonzentration von 1 % (v/v) zugesetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 2 µl MNase pro 4×10^5 Zellen für den DNA-Verdau eingesetzt. Die Länge der verdauten Fragmente wird mittels Gelelektrophorese untersucht. Für alle durchgeführten Versuche weisen sie eine inhomogene Größenverteilung mit Peaks > 4 kb auf, was über der geforderten Länge von < 1 kb liegt und Ergebnisse somit potenziell beeinflusst. Jede Immunopräzipitation wird mit 4×10^5 Zellen und 5 µg Antikörper (Cas9 7A9-3A3, Active Motif) für 14 h bei 4 °C inkubiert. Für die (ChIP)-qPCR wird der Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die verwendeten Primer für untersuchte Genloci sind in **Anhang 3** aufgeführt. Vor der qPCR im LightCycler wird die 384-Well-Platte für 1 min bei $1.000 \times g$ zentrifugiert, um den Reaktionsansatz am Boden

zu sammeln. Die Relativierung der DNA-Protein-Interaktion gegen die Positivkontrolle erfolgt nach Normalisierung auf die eingesetzte DNA-Menge.

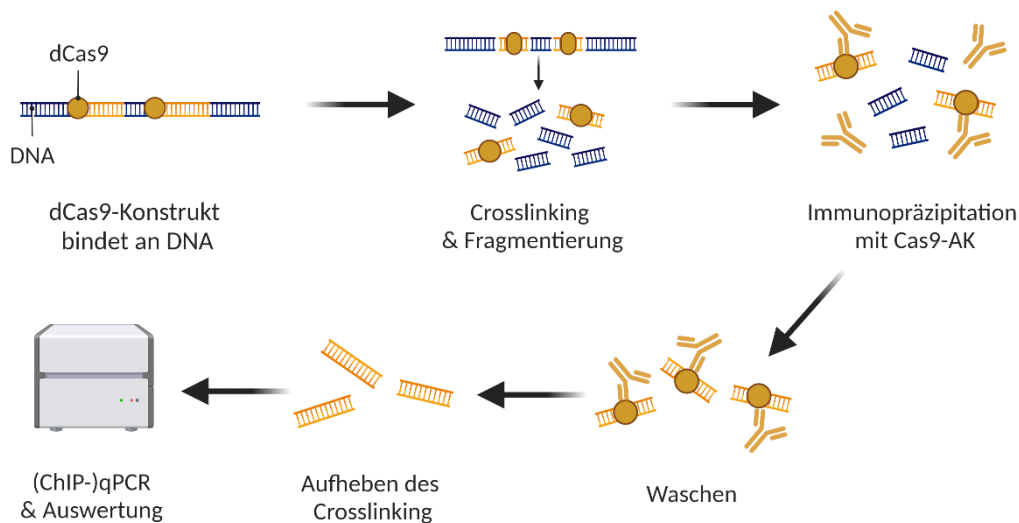


Abbildung 6: Prinzip der Chromatin-Immunopräzipitation. Die gebundene dCas9 wird zunächst mit Formaldehyd fixiert, woraufhin das Chromatin fragmentiert wird. Nach Inkubation mit dem Cas9-AK werden Fragmente ohne gebundenen Antikörper gewaschen und nach Aufhebung der Quervernetzung mittels qPCR analysiert. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

2.6 Western-Blot zur Proteinanalyse

2.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Adhärente Zellen werden durch Zugabe von 3 ml Accutase-Lösung vom Boden der T75-Zellkulturflasche gelöst. Anschließend werden 7 ml Nährmedium hinzugefügt und 1,5 ml der Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation für 30 s bei $13.000 \times g$ wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 μ l RIPA-Puffer mit zugesetzten Protease- und Phosphataseinhibitoren lysiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis werden die Proben für weitere 20 min bei $13.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.6.2 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht erfolgt mittels SDS-PAGE. Dazu werden 100 μ l Zelllysate mit 20 μ l 6x Lämmli-Puffer und 50 μM DTT versetzt und für 10 min im Thermomixer bei 95°C und 300 rpm inkubiert. Die SDS-PAGE-Kammern werden mit SDS-Puffer befüllt und mit Mini PROTEAN TGX Gele (4-20 % Gradient, 10 Wells) beladen. Nachdem

die Proben sowie der Proteinmarker PageRuler auf das Gel geladen wurden, erfolgt die Elektrophorese für 40 min bei 150 V.

2.6.3 Transfer der Proteine (Immunoblot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mittels Semi-Dry Blot auf eine PVDF-Transfermembran übertragen. Um den Immunoblot zu erstellen, werden zugeschnittene PVDF-Membranen sowie Whatman-Paper in der folgenden Reihenfolge angeordnet:

1. Whatman-Paper, benetzt mit Anodenpuffer A
2. zwei Whatman-Paper, benetzt mit Anodenpuffer B
3. PVDF-Membran, benetzt mit Methanol
4. SDS-Gel (siehe oben)
5. drei Whatman-Paper, benetzt mit Kathodenpuffer C

Der Transfer erfolgt mit 80 mA pro WB für 50 min, wonach die PVDF-Membran für 1 h in Blocking-Puffer bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken blockiert wird. Die Primärantikörper (vgl. **Tabelle 8**) werden mit demselben Blocking-Puffer verdünnt und auf den Immunoblot gegeben. Die Inkubation des Antikörpers erfolgt auf dem Blotschüttler für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend werden fünf Waschgänge mit 1x TBS-T-Puffer à 5 min durchgeführt. Die korrespondierenden Sekundärantikörper (HRP-konjugiert) werden ebenfalls mit Blocking-Puffer verdünnt und auf der Membran für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle dient ein HRP-konjugierter Beta-Aktin-Antikörper.

Tabelle 8: Verwendete Western-Blot Antikörper mit Verdünnungen.

Antikörper	Hersteller	Art	Verdünnungsfaktor
anti-VSV G Tag (#PA1-30138)	Invitrogen	Kaninchen IgG, polyklonal	1 : 5.000
anti-OLLAS Tag (NBP1-06713)	Novus Biologicals	Ratten IgG, monoklonal	1 : 5.000
anti-Myc Tag (ab32)	Abcam	Maus IgG, monoklonal	1 : 1.000
anti-Beta-Aktin HRP-konjugiert (ab49900)	Abcam	Maus IgG, monoklonal	1 : 10.000
anti-rabbit IgG HRP-konjugiert (31460)	Thermo Fisher Scientific	Ziege IgG, polyklonal	1 : 20.000
anti-rat IgG HRP-konjugiert (ab97057)	Abcam	Ziege IgG, polyklonal	1 : 5.000
anti-mouse IgG HRP-konjugiert (ab6728)	Abcam	Kaninchen IgG, polyklonal	1 : 2.500

Zur Detektion der HRP-Signale wird eine ECL-Lösung mit 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid auf die Membran gegeben. Die Belichtung erfolgt mithilfe des ChemiDoc XRS+. Um die Blotmembran für die Analyse weiterer Proteine wiederzuverwenden, werden gebundene Antikörper durch die Strong Re-Blot-Lösung entfernt und die Membran anschließend zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zugabe von Blocking-Puffer und einstündiger Inkubation wird der nächste Primärantikörper zugegeben.

2.7 Herstellung von Methylierungslibraries

Gewebe der gesunden Kontrollen stammen aus Fibroblasten sowie Organoiden, welche aus entsprechenden Biopsien von Patienten des Universitätsklinikums Regensburg hergestellt wurden (Ethikvotum 00/14 und 18-982-101). Zusätzlich werden pluripotente Stammzellen (iPSC) verwendet, die zu Kolon-Organoiden ausdifferenziert sind. Die Gruppe maligner Zellen wird sowohl durch Krebszelllinien als auch durch kommerziell erhältliche Organoiden gebildet. Alle Arbeiten werden gemäß lokaler ethischer Richtlinien sowie vereinbar mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Eine genauere Charakterisierung des Kollektivs findet sich in Kapitel 3.1.1.

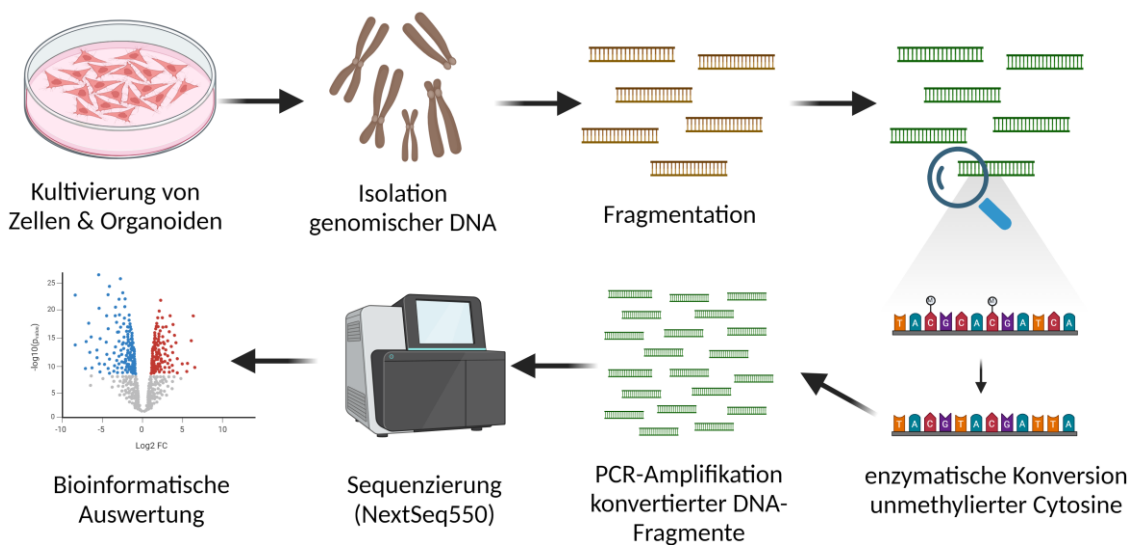


Abbildung 7: Experimenteller Workflow zur Generierung einer Methylierungslibrary. Aus kultivierten Zellen und Organoiden wird die genomische DNA extrahiert. Für das NGS muss die DNA mittels Ultraschall zu 250 bp langen Fragmenten gespalten werden. In diesen werden unmethylierte Cytosinbasen enzymatisch zu Thymin konvertiert und die Fragmente vor der Sequenzierung mittels PCR amplifiziert. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

2.7.1 Isolation genomischer DNA

Die Extraktion genomischer DNA wird mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit durchgeführt. Dafür werden die Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 13.000 rpm für 15 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 300 µl 1x DPBS gewaschen. Anschließend folgt die DNA-Isolation und Aufreinigung gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Elution der DNA-Pellets erfolgt in 30 µl Nuklease-freiem Wasser. Nach einstündiger Inkubation bei 65 °C und 300 rpm im Thermomixer wird die DNA-Konzentration photometrisch gemessen. Proben werden bei –20 °C gelagert.

2.7.2 Fragmentierung der DNA

Für die Sequenzierung muss die isolierte DNA in Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 250 bp fragmentiert werden. Dazu werden 500 ng DNA zusammen mit jeweils 2 µl des methylierten Kontrollplasmids pUC19 und der unmethylierten λ-Phage-DNA in ein PCR-Gefäß gegeben und mit 0,1x TE-Puffer auf 110 µl aufgefüllt. Die Fragmentierung erfolgt durch Ultraschall unter Verwendung des Covaris S2 gemäß dem Herstellerprotokoll mit folgenden Einstellungen: Duty Cycle 10 %, Intensität 5, Cycles per Burst 200, Dauer 180 s. Anschließend wird 1 µl der behandelten DNA-Lösung mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 und dem High Sensitivity DNA Kit gemäß Herstelleranweisungen analysiert. Sofern die Größe der fragmentierten DNA im Zielbereich liegt, wird mit der Präparation der Library fortgefahren.

2.7.3 Erstellung der Methylierungslibrary

Für die Erstellung einer Methylierungslibrary wird das NEBNext Enzymatic Methyl-seq Kit verwendet. Es wandelt unmethylierte Cytosinbasen durch enzymatische Konversion in Thymin um, anstelle die aggressivere und weniger erfolgversprechende Bisulfitmethode anzuwenden [115]. Die Library wird gemäß dem Herstellerprotokoll aufbereitet, wobei die Denaturierung der DNA mit Natriumhydroxid (0,1 M) durchgeführt wird. Die fertige Library wird erneut mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert und die DNA-Konzentration mithilfe des Qubit™ 2.0 Fluorometer bestimmt.

2.7.4 Next Generation Sequencing

Die Sequenzierung der Libraries erfolgt auf der NextSeq 550 Plattform unter Verwendung des NextSeq 500/550 High Output Kits gemäß dem Herstellerprotokoll. Für eine bessere Genomrekonstruktion wird die *paired-end* Einstellung gewählt. Die demultiplexierten Rohdaten im *.fastq-Format werden nach bioinformatischer Aufarbeitung für nachfolgende Analysen verwendet.

2.8 Bioinformatische Analyse der WGS-Daten

Die Programme und Skripte werden in der Linux-Umgebung Ubuntu 22.04 LTS ausgeführt. Sofern nicht gesondert beschrieben, werden sie entsprechend der jeweiligen GitHub-Dokumentation mit Standardparametern genutzt. Die Rohdaten aus der Sequenzierung im *.fastq-Format werden zunächst einzeln mit FastQC auf ihre Sequenzierqualität untersucht. Anschließend werden mit *TrimGalore!* aus den *Reads* diejenigen Basen vom 3'-Ende entfernt, die aufgrund eines Phred-Scores < 30 eine zu geringe Basenerkennungsqualität aufweisen. Außerdem werden sowohl die Illumina-Adaptersequenzen als auch Fragmente mit einer Gesamtlänge von < 20 bp getrimmt, um eine zuverlässige Genomrekonstruktion zu gewährleisten. Aufgrund der Verwendung des Methyl-seq Kits werden zusätzlich je 10 bp vom 5'- und 3'-Ende getrimmt.

```
trim_galore -j 4 --paired --q 30 --illumina --clip_r1 10 --clip_r2 10 --three_prime_clip_r1 10  
--three_prime_clip_r2 10 --gzip --fastqc_args "--o //Ausgabepfad/QC-Report " Rohdaten.fastq  
-o /Ausgabepfad/getrimmt
```

Befehl zum Ausführen des Trimming.

Nach erneuter Qualitätskontrolle verbleibender *Reads* mittels *FastQC* erfolgt das *Alignment* gegen das Referenzgenom GRCh38.p13 (bezogen von Ensembl.org) sowie gegen die Methylierungskontrollen pUC19 und λ -Phage-DNA. Hierfür wird *Bismark* verwendet. Abweichend von den Standardparametern wird für die Reportinggrenze des *Alignment-Scores* „--score_min L,0,-0.4“ definiert. Die ausgegebene *.bam-Datei wird mittels *Bismark* dedupliziert, wodurch *Reads* entfernt werden, die sich an exakt gleicher Position und Ausrichtung am Referenzgenom befinden. Dies dient der Entfernung von PCR-Duplikaten, die einen *Bias* verursachen können. Um die Methylierung einzelner Cytosinbasen der Proben zu extrahieren, wird mittels *bismark_methylation_extractor* eine *Coverage*-Datei (*.cov) erstellt.

Auf Basis der CpG-Methylierungsniveaus aus dem *Bismark Alignment Report* wird die Konversionseffizienz unmethylierter Cytosinbasen berechnet. Die Visualisierung der Methylierung sowie die Berechnung der Genom-Abdeckung durch die Sequenzierung erfolgt mit *Seqmonk*. Zur Identifikation differenzieller Methylierung wird das R-Paket *DSS* verwendet. Im Rahmen des DML-Tests werden Methylierungsniveaus unter Verwendung eines gleitenden Durchschnitts geglättet. Die Annotation differenziell methylierter Regionen wird mit dem R-Paket *annotatr* entsprechend Ensembl Version 106 von GRCh38.p13 durchgeführt [116].

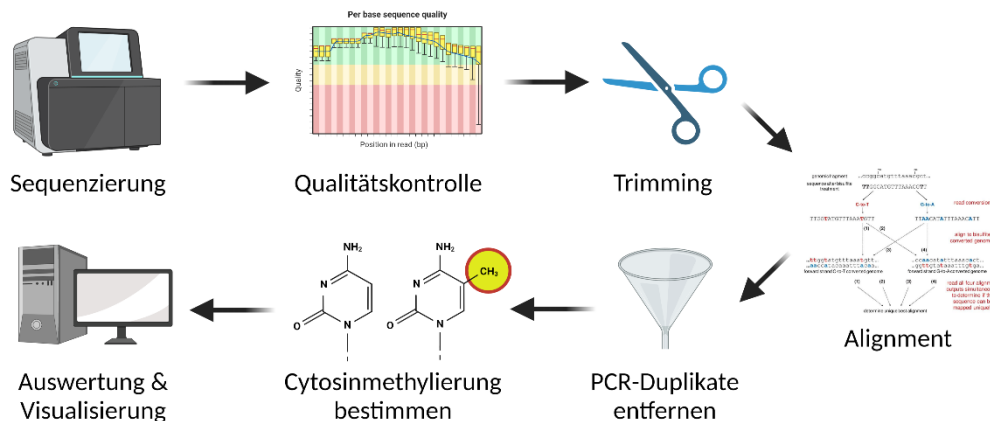


Abbildung 8: Bioinformatischer Workflow der Sequenzierdaten. Die Reads werden nach Prüfung sequenzierter Rohdaten auf ihre Basenerkennungsqualität getrimmt. Anschließend erfolgt nach erneuter Qualitätskontrolle (hier nicht dargestellt) mit dem *Alignment* die Genomrekonstruktion. PCR-Duplikate werden entfernt und der Methylierungszustand aller Cytosinbasen extrahiert. Schließlich werden die Daten visualisiert und hinsichtlich ihrer differentiellen Methylierung ausgewertet. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt, die Darstellung des *Alignment*-Algorithmus wurde von *Krueger et al.* übernommen [108].

2.9 Statistische Analyse

Statistische Analysen werden für die Identifikation differenziell methylierter Loci und Regionen mithilfe von *DSS* durchgeführt. Andere statistische Berechnungen erfolgen mit GraphPad Prism. Standardmäßig erfolgt die Berechnung von Signifikanzniveaus mittels Welch's t-Test. P-Werte ab $p \leq 0,05$ gelten als statistisch signifikant. Sofern nicht anders angegeben, werden die Experimente in Triplikaten durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Methylierungsmuster des kolorektalen Karzinoms

3.1.1 Evaluation der Sequenzierungsdaten zur Identifikation spezifischer Methylierungsmuster im kolorektalen Karzinom

Zur Bestimmung von spezifischen Methylierungsmustern des KRK wird die DNA der in **Tabelle 9** aufgeführten Zellen bzw. Gewebe extrahiert. Es folgt die enzymatische Konvertierung von den unmethyliert vorliegenden Cytosinbasen in Thyminbasen während der Library-Vorbereitung. Sämtliche Proben werden in technischen Duplikaten aufbereitet und anschließend mittels WGS (*Whole Genome Sequencing*) sequenziert. Die Probe F7 wird von weitergehenden bioinformatischen Analysen zur Identifikation von DMR (*differenziell methylierte Regionen*) ausgeschlossen, da es sich um die Probe eines Patienten mit diagnostiziertem Rektumkarzinom handelt. Zwar stammt das Biopsat aus endoskopisch unauffälligem Areal, ein potenzieller *Bias* soll jedoch durch die Exklusion vermieden werden. Andere Proben werden den Gruppen maligne (n = 3) und gesund (n = 7) zugeordnet. Bei zwei der drei malignen Proben handelt es sich um KRK-Zelllinien, bei einer der Proben um ein Tumororganoid. Als gesundes Kontrollgewebe dienen neben einem Organoid aus zu Kolongewebe differenzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) auch sechs Organoid aus biopsiertem Patientengewebe. Hiervon sind 4 Patienten bzw. 67 % männlich, 2 Patienten bzw. 33 % weiblich, wobei das Alter im Median bei 54 Jahren liegt. Alle untersuchten Biopsien stammen aus dem Sigma.

Tabelle 9: Übersicht analysierter Proben.

Bezeichnung	Typ	Alter / Geschlecht Diagnose / Entnahmeort	Anmerkung
HCT116 WT	Krebszelllinie	48 Jahre / männlich Adeno-CA / Colon ascendens	vgl. Tabelle 5
CaCo2	Krebszelllinie	72 Jahre / männlich Adeno-CA / ---	vgl. Tabelle 5
C18	Tumororganoid	88 Jahre / männlich Adeno-CA (IIA) / Sigma	vgl. Tabelle 5
iPSC	gesundes Organoid	---	vgl. Tabelle 5
F1	gesundes Patientenorganoid	51 Jahre / männlich M. Crohn / Sigma	
F2	gesundes Patientenorganoid	57 Jahre / männlich M. Crohn / Sigma	
F3	gesundes Patientenorganoid	72 Jahre / männlich Colitis ulcerosa / Sigma	
F4	gesundes Patientenorganoid	59 Jahre / weiblich Kontrolle / Sigma	

F5	gesundes Patientenorganoid	43 Jahre / männlich Colitis ulcerosa / Sigma	
F6	gesundes Patientenorganoid	36 Jahre / weiblich M. Crohn / Sigma	
F7	gesundes Patientenorganoid	66 Jahre / männlich Rektum-CA / aus gesundem Rektum	ausgeschlossen ³

Sequenzierte Rohdaten werden zur Qualitätskontrolle zunächst auf deren Basenerkennungsqualität geprüft. Im Durchschnitt über alle sequenzierten DNA-Fragmente zeigt sich ein Phred33-Score von > 20. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von > 99 % für eine korrekte Basenerkennung beim WGS.

Zusätzlich wird der Konversionserfolg der unmethylierten Cytosinbasen evaluiert. Hierfür werden die von *Bismark* ausgegebenen β -Scores⁴ der DNA-Kontrollen pUC19 sowie λ -Phage mit ihren tatsächlichen CpG-Methylierungsniveaus verglichen. Die Kontrolle pUC19 soll vollständig methyliert, die λ -Phagen-DNA vollständig unmethyliert vorliegen. Sämtliche Proben zeigen für pUC19 eine hohe ($\beta_{\text{mean}} = 94,36 \% / \text{SD} = 4,48 \%$), für die λ -Phagen-DNA eine niedrige relative Anzahl methylierter CpG ($\beta_{\text{mean}} = 0,29 \% / \text{SD} = 0,16 \%$) (vgl. **Abbildung 9 A**). $\beta_{\text{mean}}(\text{pUC19})$ wird als ausreichend angesehen, da das Plasmid laut Herstellerinformationen durch enzymatische Methylierung lediglich eine 96-98 %-ige CpG-Methylierung erreicht [117]. Anhand von $\beta_{\text{mean}}(\lambda\text{-Phage}) = 0,29 \%$ lässt sich eine durchschnittliche Konversionsrate $K = 100 \% - 0,29 \% = 99,71 \%$ über alle Proben bestimmen. Für keine gemessene Probe ergibt die Kontrolle des $\beta_{\text{mean}}(\lambda\text{-Phage}) > 0,7 \%$. Es wird also eine erfolgreiche Konversion für die untersuchten Proben angenommen, weswegen kein Datensatz verworfen werden muss.

Um die Aussagekraft der β -Werte auf CpG-Ebene einzelner Proben bewerten zu können, wird die durchschnittliche *Coverage* auf das gesamte Genom bezogen betrachtet (vgl. **Abbildung 9 B**). Hierbei handelt es sich um die durchschnittliche Anzahl an *Reads*⁵, die einen CpG-Locus abdecken. Für die Zelllinien HCT116 WT & CaCo2 beträgt die durchschnittliche *Coverage* 2,99 (SD = 0,24), für Proben aus Patientenmaterial bzw. Organoiden 0,96 (SD = 0,59).

³ Daten der Probe F7 wurden von der Bestimmung differenzieller Methylierung ausgeschlossen, um Beeinflussungen durch eventuell bestehende Methylierungsalterationen von endoskopisch unauffälligem Gewebe bei einem an KHK erkrankten Patienten zu verhindern.

⁴ Beim β -Score handelt es sich um einen Wert zwischen 0 und 1, welcher das Methylierungsniveau eines CpG-Locus oder eines Genomabschnittes darstellt. Hier entspricht der β -Score der relativen Frequenz von methylierten CpG-Loci innerhalb der Kontroll-DNA.

⁵ Ein *Read* entspricht einem einzelnen DNA-Fragment, das während des NGS sequenziert wird.

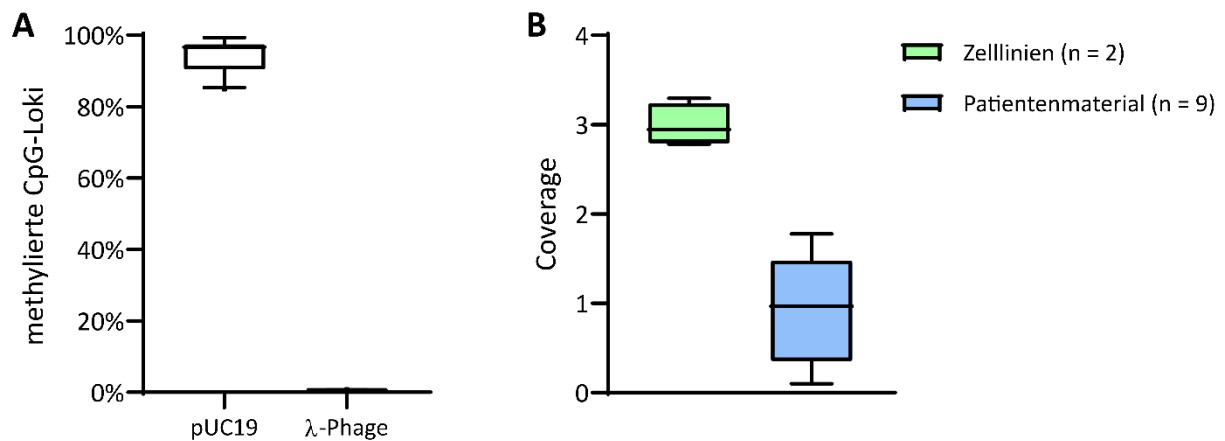


Abbildung 9: Konversion unmethylierter Cytosinbasen & Coverage von Sequenzierungen. (A) Relative Häufigkeit methylierter CpG-Loci innerhalb der Kontroll-DNA pUC19 sowie λ-Phage gemäß *Bismark Alignment Report*. (B) Durchschnittliche Genom-Coverage nach Durchführung des bioinformatischen Workflows mit Trimming & PCR-Deduplikation. Fehlerbalken repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall. Die Proben werden jeweils in technischen Duplikaten aufgearbeitet und sequenziert.

3.1.2 Epigenetisches Profil: Globale Methylierungsmuster im gesunden und malignen Genom

Zur Darstellung globaler Methylierungsmuster erfolgt mithilfe des „Bisulfite Pipeline“-Algorithmus (*Seqmonk*) die Berechnung von β -Scores für definierte Abschnitte innerhalb des humanen Referenzgenoms. Hierfür wird das Genom zunächst in Abschnitte mit einer Länge von jeweils 10 kb unterteilt. Im Scatterplot (vgl. **Abbildung 10 A**) stellen sich diejenigen 10 kb Abschnitte auf einer Diagonalen dar, welche sowohl für maligne als auch für Kontrollproben gleiche β -Scores aufweisen. Es zeigt sich eine Häufung hoher Methylierungsniveaus bei malignen Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollproben. Zugleich besteht bei Betrachtung der 10 kb Segmente eine erhöhte Variabilität der β -Scores für malignes Gewebe, wobei auch hypomethylierte Elemente zahlreich auftreten (vgl. **Abbildung 10 B**). Aufgrund des Methylierungs-Shifts sowohl nach rechts als auch nach links in **Abbildung 10 A** ist im untersuchten Probenkollektiv von differenziellen Methylierungsmustern zwischen gesunden und malignen Proben auszugehen.

Um die Methylierung innerhalb der CpG-Inseln zu untersuchen, werden auch deren β -Scores bestimmt. Hierfür werden ausschließlich die Genregionen betrachtet, die CpG-Inseln umfassen (gemäß Ensembl v.106 von GRCh38.p13). Insgesamt zeigen maligne Proben auch hier eine gehäufte Hypermethylierung (vgl. **Abbildung 11 A**). Sowohl in malignem als auch in gesundem Gewebe liegt die Mehrheit der CpG-Inseln entweder unmethyliert oder nahezu vollständig methyliert vor (vgl. **Abbildung 11 B**).

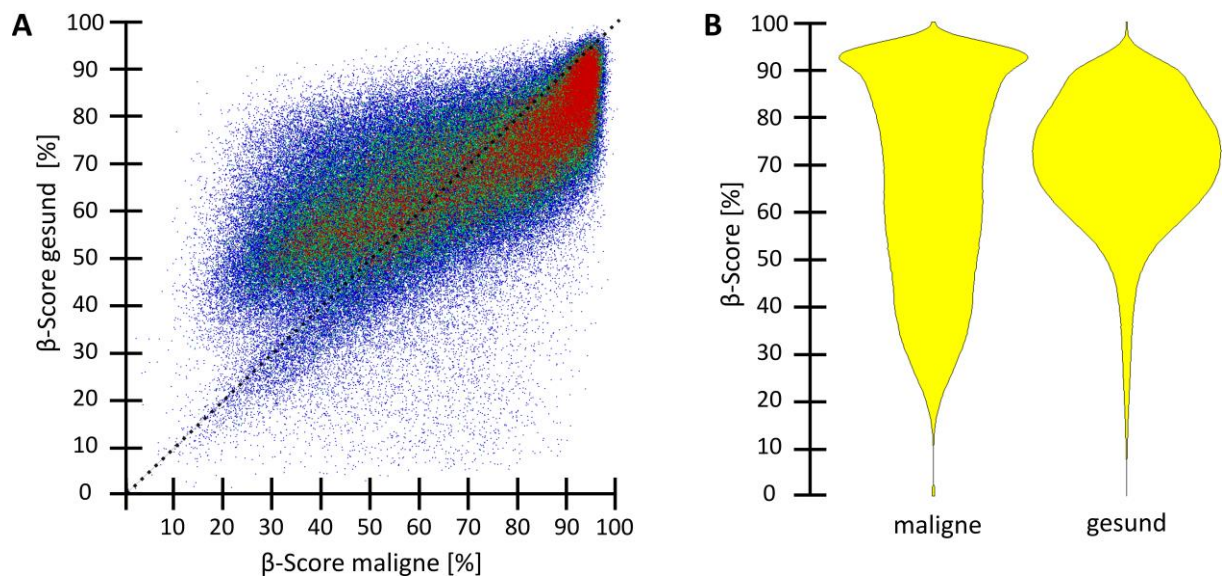


Abbildung 10: Methylierungsmuster von 10 kb langen Genabschnitten. (A) Im Scatterplot repräsentiert jeder Punkt einen 10 kb Abschnitt. Punkte, die auf der gepunkteten Linie ($y = x$) verlaufen, weisen innerhalb des betrachteten Genomsegments gleiche β -Scores für malignes und gesundes Gewebe auf. Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson $r = 0,694$. (B) Die Breite des Beanplots trägt qualitativ die Anzahl der 10 kb Elemente mit den jeweiligen β -Scores auf.

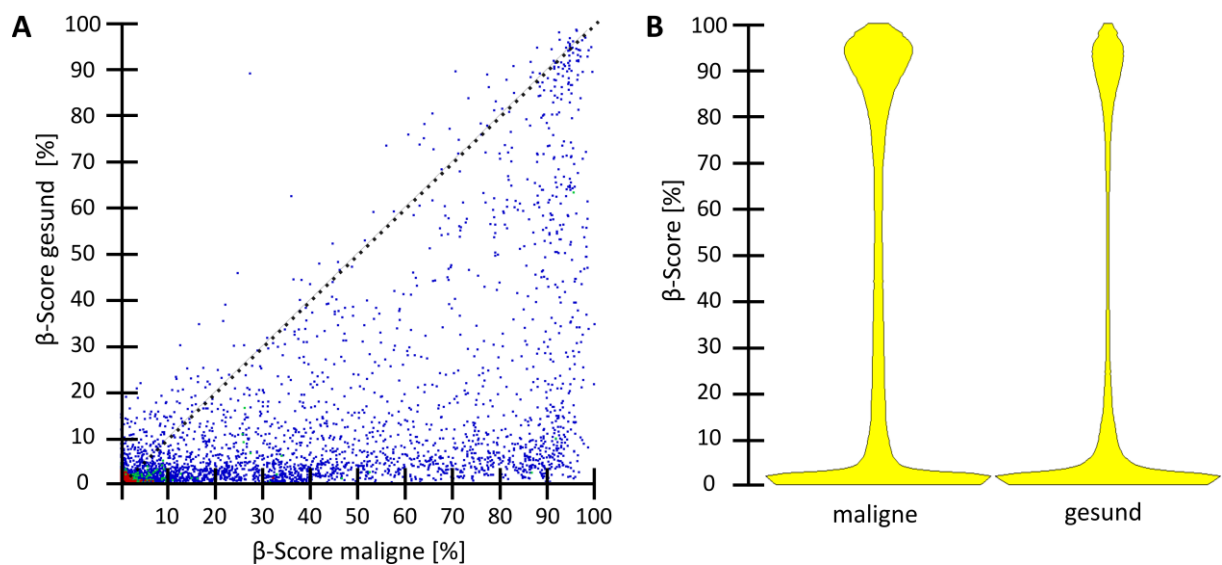


Abbildung 11: Methylierung innerhalb von CpG-Inseln. (A) Ein Punkt repräsentiert eine CpG-Insel unabhängig von ihrer Länge. Datenpunkte, welche auf der gepunkteten Linie ($y = x$) verlaufen, weisen für die betrachtete Region gleiche β -Scores für malignes und gesundes Gewebe auf. Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson $r = 0,614$. (B) Die Breite des Beanplots zeigt die relative Häufigkeit von CpG-Inseln mit jeweils aufgetragenen β -Scores.

3.1.3 Identifikation differenziell methylierter CpG-Loci

Um Regionen mit signifikanten Methylierungsunterschieden zu identifizieren, erfolgt zunächst die Analyse auf CpG-Ebene. Mithilfe der Funktion *callDML* (*DSS*) werden differenziell methylierte Cytosinbasen im CpG-Kontext, sogenannte DML (*differenziell methylierte Loci*), und deren statistische Signifikanz ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden durch *DSS* mittels t-Test berechnet und nach Benjamini-Hochberg korrigiert. Folgend werden diese adjustierten p-Werte als *fdr* bezeichnet. Die Zuteilung der Proben in maligne und gesunde Kontrollen zur Identifikation der DML erfolgt gemäß **Tabelle 10**.

Insgesamt werden 976.239 DML ($fdr \leq 0,001$) gefunden. Hiervon weisen 971.483 bzw. 99,51 % eine Hypermethylierung maligner Proben gegenüber den Kontrollen auf, 4.756 bzw. 0,49 % eine Hypomethylierung.

Tabelle 10: Zuteilung verwendeter Datensätze. Es handelt sich jeweils um Daten im *.cov-Format, welche durch *Bismark* ausgegeben und zur Ermittlung der DML mittels *DSS* verwendet werden.

gesunde Kontrolle				maligne	
F1_1	F3_1	F5_1	iPSC_1	HCT116_1	C18_1
F1_2	F3_2	F5_2	IPSC_2	HCT116_2	C18_2
F2_1	F4_1	F6_1		CaCo2_1	
F2_2	F4_2	F6_2		CaCo2_2	

3.1.4 Zusammenfassung zu differenziell methylierten Regionen

Basierend auf den DML werden DMR variabler Länge ermittelt. Diese Kalkulation erfolgt mit verschiedenen Werten für den Parameter delta (folgend als δ bezeichnet) der Funktion *callDMR* (*DSS*). Nur diejenigen DML werden in die Ermittlung der DMR einbezogen, deren a posteriori Wahrscheinlichkeit (*pp*) für eine unterschiedliche Methylierung mit $|\Delta\beta| > \delta$ $pp < 0,001$ entspricht.

Tabelle 11: Anzahl identifizierter DMR in Abhängigkeit von δ .

	gesamt	davon hypermethyliert	davon hypomethyliert
$\delta > 0,0$	81.656	63.786	17.870
$\delta > 0,1$	37.534	32.217	5.317
$\delta > 0,2$	15.693	14.683	1.010
$\delta > 0,3$	6.914	6.778	136
$\delta > 0,4$	3.488	3.475	13
$\delta > 0,5$	1.417	1.415	2
$\delta > 0,6$	111	111	0

Tabelle 11 zeigt die Anzahl identifizierter DMR in Abhängigkeit von δ . Höhere Werte gehen hierbei überwiegend mit hypermethylierten DMR einher. Ab $\delta > 0,4$ liegt die relative

Häufigkeit von in malignem Gewebe hypomethylierten DMR unter 1 % (vgl. **Abbildung 12 A**). Exemplarisch für $\delta > 0,0$ wird in **Abbildung 12 B** die Anzahl identifizierter DMR in Abhängigkeit der differentiellen Methylierung in Form eines Histogramms aufgetragen. Sowohl für den Bereich relativer Hypermethylierung als auch relativer Hypomethylierung zeigt sich ein Peak. Dieser liegt im Bin $-0,275 < \Delta\beta < -0,225$ bzw. bei $0,325 < \Delta\beta < 0,375$.

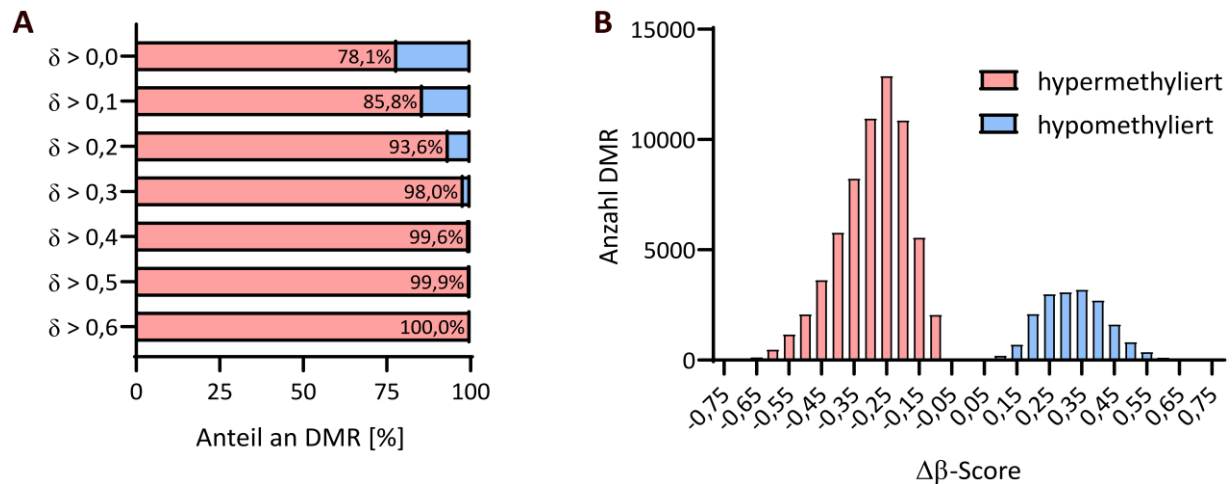


Abbildung 12: Verteilung identifizierter DMR. (A) Verteilung in hyper- und hypomethylierte DMR für unterschiedliche δ . Rot symbolisiert die im malignen Gewebe hypermethylierten, blau die hypomethylierten DMR. (B) Histogramm mit absoluter Häufigkeit der DMR (für $\delta > 0,0$), welche die Methylierungsunterschiede $\Delta\beta$ aufweisen. Die konstante Breite der Bins beträgt 0,05. Negative Werte für $\Delta\beta$ entsprechen einer Hypermethylierung, positive einer Hypomethylierung maligner Proben.

Die Länge einzelner DMR liegt im Median zwischen 158 bp für $\delta > 0,6$ und 405 bp für $\delta > 0,4$ (vgl. **Abbildung 13 A**). Die Anzahl der CpG-Loci innerhalb der Regionen liegt im Median zwischen 16 für $\delta > 0,0$ und 64 für $\delta > 0,4$ (vgl. **Abbildung 13 B**). Der Quotient $\frac{\text{Anzahl CpG-Loci}}{\text{Länge DMR}}$ wird als Maß des CpG-Anteils innerhalb der DMR bestimmt. Ein hoher Wert kommt beispielsweise durch CpG-Inseln zustande. In diesen kann die Methyl-Binding-Domain des Reportersystems binden (vgl. Kapitel 1.3). Strengere Werte für δ korrelieren ($r = 0,986 / 95 \% \text{ CI } [0,9038 - 0,9980]$) mit einem höheren Median dieses Quotienten (vgl. **Abbildung 13 C**).

Um anhand differentiell methylierter Regionen bestimmte Gene als potenzielle Biomarker des KRK zu identifizieren, werden die DMR entsprechend annotiert. Hierfür werden sie in der Nähe liegenden genomischen Merkmalen (Promotor, Intron, Exon, CpG-Insel sowie CpG-Shore) sowie den jeweiligen Genen zugeordnet. Aufgrund von Überlappungen erhält eine DMR oftmals eine Vielzahl an Annotationen (vgl. **Tabelle 12**). Nachfolgend werden Gene als

differenziell methyliert betrachtet, wenn sie mindestens eine DMR innerhalb ihres Promotors aufweisen.

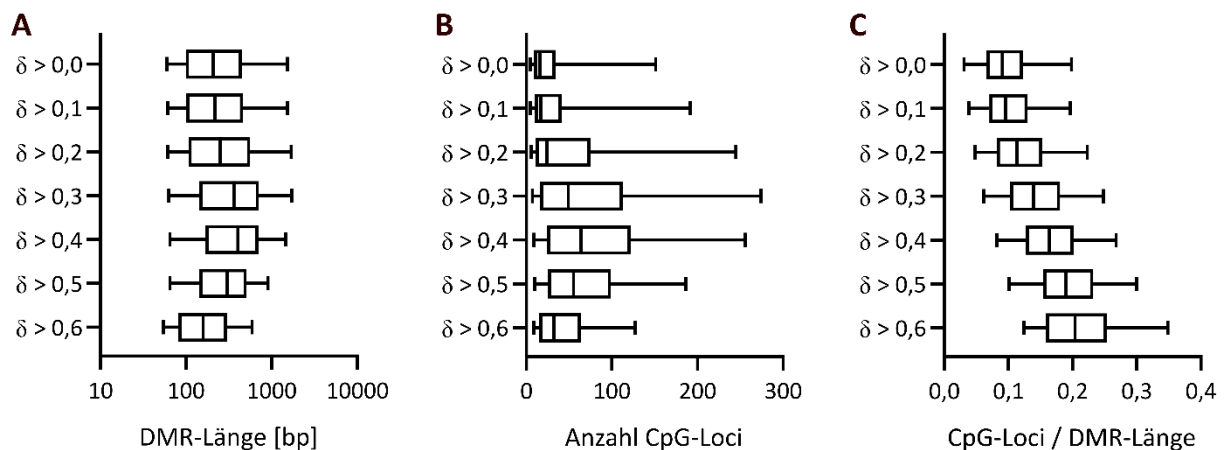


Abbildung 13: Charakterisierung differenziell methylierter Regionen hinsichtlich (A) ihrer Länge sowie (B) der Anzahl der CpG-Loci innerhalb der Regionen. (C) stellt mit dem Quotienten Anzahl CpG-Loci pro DMR-Länge die durchschnittliche CpG-Dichte innerhalb der DMR dar. Die Fehlerbalken entsprechen den 5-95 Perzentilen.

Zur Identifikation von DMR, die für das Methylierungsreportersystem geeignet sind, wird primär auf die Liste der DMR mit $\delta > 0,3$ zurückgegriffen. Diese stellt gemäß obiger Charakterisierung einen geeigneten Kompromiss aus Regionen ausreichender Länge bei entsprechender CpG-Dichte und Methylierungsunterschieden dar. Gleichzeitig werden durch den Algorithmus nicht zu viele potenzielle Biomarker verworfen, die den Anforderungen nicht genügen. Zur übersichtlicheren Darstellung werden jedoch in folgenden Graphen lediglich die DMR mit $\delta > 0,0$ dargestellt. Sie umfassen für die ausgewählten Regionen in der Regel mehrere der strenger kalkulierten DMR und bieten somit einen hinreichenden Überblick.

Tabelle 12: Anzahl an Annotationen für ermittelte DMR.

	Promotor	Intron	Exon	CpG-Insel	CpG-Shore
$\delta > 0,0$	60.707	319.860	86.141	13.990	23.784
$\delta > 0,1$	29.432	155.315	44.944	8.670	14.601
$\delta > 0,2$	16.841	65.042	24.826	6.138	8.586
$\delta > 0,3$	9.376	28.340	13.823	4.201	4.632
$\delta > 0,4$	5.333	1.2727	7.230	2.701	2.100
$\delta > 0,5$	2.091	4.732	2.658	1.251	464
$\delta > 0,6$	124	333	193	100	14

3.1.5 In silico identifizierte hypermethylierte Biomarker

Aus den differenziell methylierten Genen werden für die Implementierung des Reportersystems geeignete potenzielle hypermethylierte Biomarker ausgewählt. Die Auswahlkriterien beinhalten eine ausgeprägte Methylierungsdifferenz zwischen malignem

und gesundem Gewebe sowie einen hohen *areaStat*-Wert⁶ der DMR als Maß statistischer Signifikanz. Zudem wird ein Overlap zwischen der DMR und einer CpG-Insel als Bindemöglichkeit für die MBD des Reporters vorausgesetzt. Weiterführend untersuchte Gene, deren Promotorregionen DMR enthalten, finden sich in **Tabelle 13**. Als Kontrollen werden die Housekeeping-Gene *GAPDH*, *GPI*, *UBC*, *PPIA* und *B2M* verwendet.

Tabelle 13: Hypermethylierte Biomarker-Kandidaten des kolorektalen Karzinoms. Werte für $\Delta\beta$ entsprechen der Berechnung (*diff_Meth*) durch *DSS*. Angegeben sind jeweils die Charakteristika der DMR für $\delta > 0,0$. Negative Werte für $\Delta\beta$ bedeuten eine Hypermethylierung zugunsten maligner Proben.

	$\Delta\beta$ innerhalb DMR ($\delta > 0$)	Länge DMR	Anzahl CpG
ALX3	-0,52	3.109	445
DLX4	-0,63	3.320	287
EN1	-0,47	14.358	1.153
EN2	-0,51	7.931	626
FOXC2	-0,6	4.199	576
GAD2	-0,54	3.885	452
GATA5	-0,6	5.654	480
IKZF1	-0,56	4.306	437
IRF4	-0,57	2.820	421
LONRF2	-0,62	1.365	318
MNX1	-0,61	8.287	612
MSX1	-0,53	3.391	183
NKX1-1	-0,57	6.532	1.029
PCDH7	-0,5	4.490	610
PCDH8	-0,57	3.342	567
PDX1	-0,54	6.006	312
RASAL3	-0,64	6.465	280
SALL3	-0,55	9.329	1.210
SCTR	-0,56	5.710	164
SDC2	-0,31	1.228	179
SIX1	-0,38	956	140
SOX1	-0,41	7.763	1.073
TFPI2	-0,53	595	36
TP73	-0,53	1.402	214
VWC2	-0,47	2.998	530

Bereits auf Gen-Ebene zeigt sich eine teils signifikante Differenz der β -Scores (vgl. **Abbildung 14 A-C**). Bei spezifischer Betrachtung der identifizierten DMR ist dieser Unterschied noch ausgeprägter (vgl. **Abbildung 14 D-E**). Hier werden lediglich die DMR für $\delta > 0,0$ dargestellt. Für die ausgewählten Bereiche gilt, dass bei strengem δ mehrere

⁶ Bei *areaStat* handelt es sich um einen Wert, der durch *DSS* für jede DMR berechnet wird. Hierfür wird die Summe der t-Statistiken aller enthaltenen CpG-Loci gebildet und entsprechend der Anzahl enthaltener CpG-Dinukleotide gewichtet.

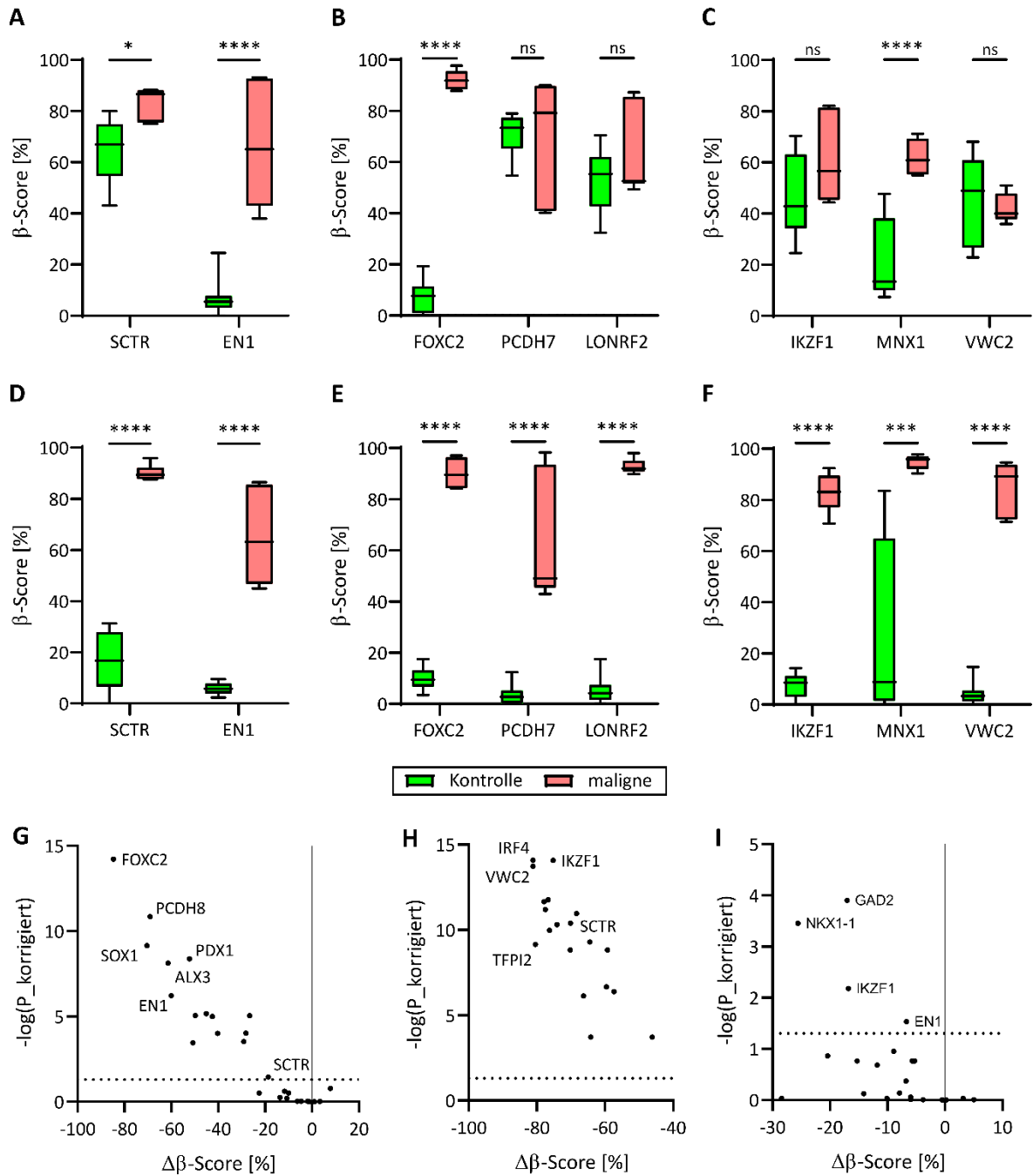


Abbildung 14: Differenzielle Methylierung der Biomarker-Kandidaten. (A)-(C) Methylierung innerhalb ausgewählter Gene. (D)-(E) Methylierung innerhalb der DMR (für $\delta > 0,0$) der zugehörigen Gene. Fehlerbalken repräsentieren die 5-95 Perzentilen. (G) verdeutlicht in Form eines Volcano-Plots die statistisch signifikante differenzielle Methylierung auf Ebene einzelner Gene und (H) auf Ebene der DMR (für $\delta > 0,0$). (I) demonstriert die differenziell methylierten DMR der Probe F7 (verglichen mit gesunder Kontrolle). Die gepunktete Linie auf $y = -\log(0,05)$ stellt jeweils den Cutoff für signifikante Ergebnisse dar. Die senkrechte Linie markiert $x = 0$. Negative Werte für $\Delta\beta$ zeigen eine Hypermethylierung malignen Gewebes, positive Werte eine Hypomethylierung an. Signifikanzniveaus bzw. korrigierte P-Werte werden mittels Holm-Sidak t-Test berechnet (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$). Verwendete β -Scores entstammen dem Bisulfite-Algorithmus (Seqmonk).

kleinere Regionen identifiziert werden, welche sich innerhalb der hier abgebildeten DMR ($\delta > 0$) befinden. Somit bietet diese Art der Darstellung einer größer gefassten Region einen

Überblick, wenngleich $\Delta\beta$ bei strenger gewähltem δ größer ausfällt. Außerdem steigt der Quotient $\frac{\text{Anzahl CpG-Loci}}{\text{Länge DMR}}$ für höhere δ , was durch einen erhöhten Anteil von CpG-Inseln an diesen strikter kalkulieren DMR bedingt wird (vgl. Kapitel 3.1.4).

Die deutliche differenzielle Methylierung wird auch anhand eines Volcano-Plots verdeutlicht (vgl. **Abbildung 14 G-H**). Alle vorher ausgewählten hypermethylierten Gene (vgl. **Tabelle 13**) weisen insbesondere auf DMR-Ebene anhand von $\Delta\beta$ eine signifikante Methylierungsdifferenz auf. Sie werden für die Implementierung in das Reportersystem verwendet. Interessanterweise zeigt auch die Probe F7, die aus einem gesunden Kolonabschnitt eines Patienten mit KRK stammt, eine signifikante differenzielle Methylierung innerhalb der DMR der Gene *EN1*, *GAD2*, *IKZF1* & *NKX1-1* (vgl. **Abbildung 14 I**).

3.1.6 Schlüsselrolle differenziell methylierter Gene als Regulatoren der Zelle

Zur weiteren Charakterisierung differenziell methylierter Gene erfolgt eine Analyse auf Basis der *Gene Ontology*. Hierbei wird untersucht, inwieweit innerhalb der DMR-Genliste für $\delta > 0,3$ Gene bestimmter biologischer Prozesse verglichen mit der Gesamtheit des humanen Genoms überrepräsentiert vorliegen.

Bezüglich der „Panther Pathways“ zeigen sich in unserem vorliegenden Datensatz unter anderem überrepräsentiert (vgl. **Abbildung 15 A**):

- *Wnt signaling* (P00057, 2,44-fach, $\text{fdr} = 4,32 \times 10^{-24}$)
- *Cadherin signaling* (P00012, 3,12-fach, $\text{fdr} = 1,95 \times 10^{-25}$)
- *Endothelin signaling* (P00019, 2,34-fach, $\text{fdr} = 7,72 \times 10^{-6}$)

Auch bei Betrachtung der detaillierteren Annotationen „Panther GO-Slim Biological Process“ ist neben den regulatorischen Prozessen ebenfalls der Wnt Signalweg innerhalb vorliegender Genliste statistisch signifikant überrepräsentiert (vgl. **Abbildung 15 B**):

- *developmental process* (GO:0032502, 2,24-fach, $\text{fdr} = 6,63 \times 10^{-79}$)
- *regulation of cellular process* (GO:0050794, 1,45-fach, $\text{fdr} = 3,94 \times 10^{-62}$)
- *biological regulation* (GO:0065007, 1,39-fach, $\text{fdr} = 1,41 \times 10^{-58}$)
- *cell fate commitment* (GO:0045165, 3,72-fach, $\text{fdr} = 7,57 \times 10^{-14}$)
- *Wnt signaling pathway* (GO:0016055, 3,18-fach, $\text{fdr} = 6,21 \times 10^{-9}$)

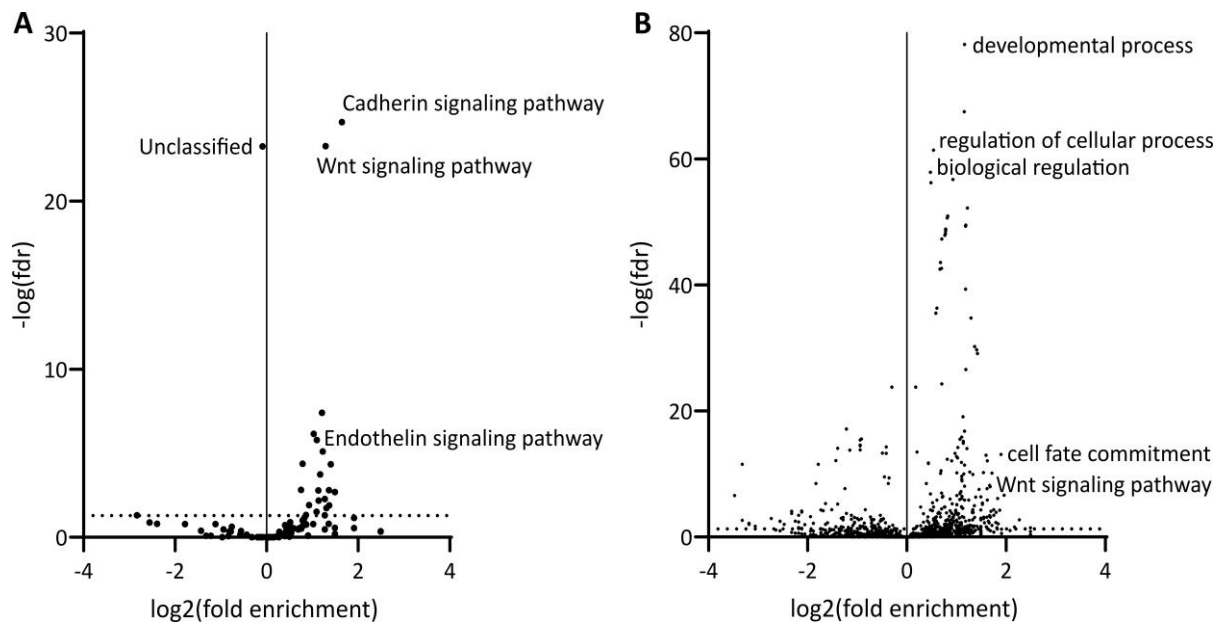


Abbildung 15: Gene Ontology Analyse differenziell methylierter Gene. Untersucht wird die Zugehörigkeit zu (A) „Panther Pathways“ bzw. (B) „Panther GO-Slim Biological Process“. Signifikanzen sind mithilfe des Fisher Exact Tests bestimmt und korrigiert nach Benjamini-Hochberg als fdr angegeben. Die senkrechte Linie markiert jeweils $x = 0$, die horizontal gepunktete Linie zeigt bei $y = -\log(0,05)$ den Cutoff statistisch signifikanter Ergebnisse.

3.2 Etablierung eines Methylierungsreportersystems

3.2.1 Evaluation des Reportersystems anhand hypermethylierter Biomarker

Für die weitere Etablierung des Reportersystems zur Detektion hypermethylierter Regionen werden die in Abschnitt 3.1.5 identifizierten Biomarker-Kandidaten herangezogen. Für sie werden sgRNA erstellt, die innerhalb der DMR ($\delta > 0,3$) liegen und dabei randständig differenziell methylierte CpG-Inseln flankieren. Untersuchte Gene werden von bis zu drei sgRNA erfasst (vgl. **Anhang 2**). Um mehrere Gene parallel zu untersuchen, werden diese zu Biomarkerpanels mit zwei bis vier Markern zusammengeführt.

Um neben der Signalinduktion im Vergleich mit unmethylierten Housekeeping-Genen auch die signifikante Aktivierung der flipNluc durch die rekonstituierte splitTEV-Protease zu zeigen, werden zwei Plasmide verwendet. Plasmid 1 enthält neben dem MBD-Konstrukt mit TEVp3-70aa auch die flipNluc sowie sechs sgRNA, welche an die untersuchten genomischen Regionen binden. Im Folgenden wird dieses Plasmid jeweils nach den Zielgenen (bspw. „EN1_SCTR“) benannt. Als zusätzliche Kontrolle wird mit *empty guide* eine Variation bezeichnet, die in der sgRNA keine Zielsequenz besitzt. Plasmid 2 beinhaltet das dCas9-Konstrukt mit TEVp61-242aa. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise des Reportersystems findet sich in Kapitel 1.3.

Bei Ko-Transfektion von Plasmid 1 mit hypermethylierten Zielgenen der sgRNA in Kombination mit Plasmid 2 entsteht Lumineszenz aufgrund der flipNluc, die durch die freiwerdende TEV-Protease induziert wird. Tatsächlich zeigt sich in **Abbildung 16** ein signifikant gesteigertes Signal im Vergleich zur Negativkontrolle *UBC_PPIA_B2M*. Allerdings ist auch bei Solo-Transfektion von Plasmid 1 ein Signal messbar, welches sich für *DLX4_NKX1-1_GATA5*, *IKZF1_MNX1_VWC2* sowie *RASAL3_TP73_SIX1* nicht signifikant von dem des zusammengesetzten Reportersystems unterscheidet. Auch *empty guide* weist in Kombination mit dem dCas9-Konstrukt Lumineszenz auf. Für die Biomarkerpanel *FOXC2_LONRF2_PCDH7*, *GAD2_IRF4_SOX1* und *EN1_SCTR* ist hingegen bei Ko-Transfektion eine Induktion verglichen mit fehlendem Plasmid 2 zu erkennen.

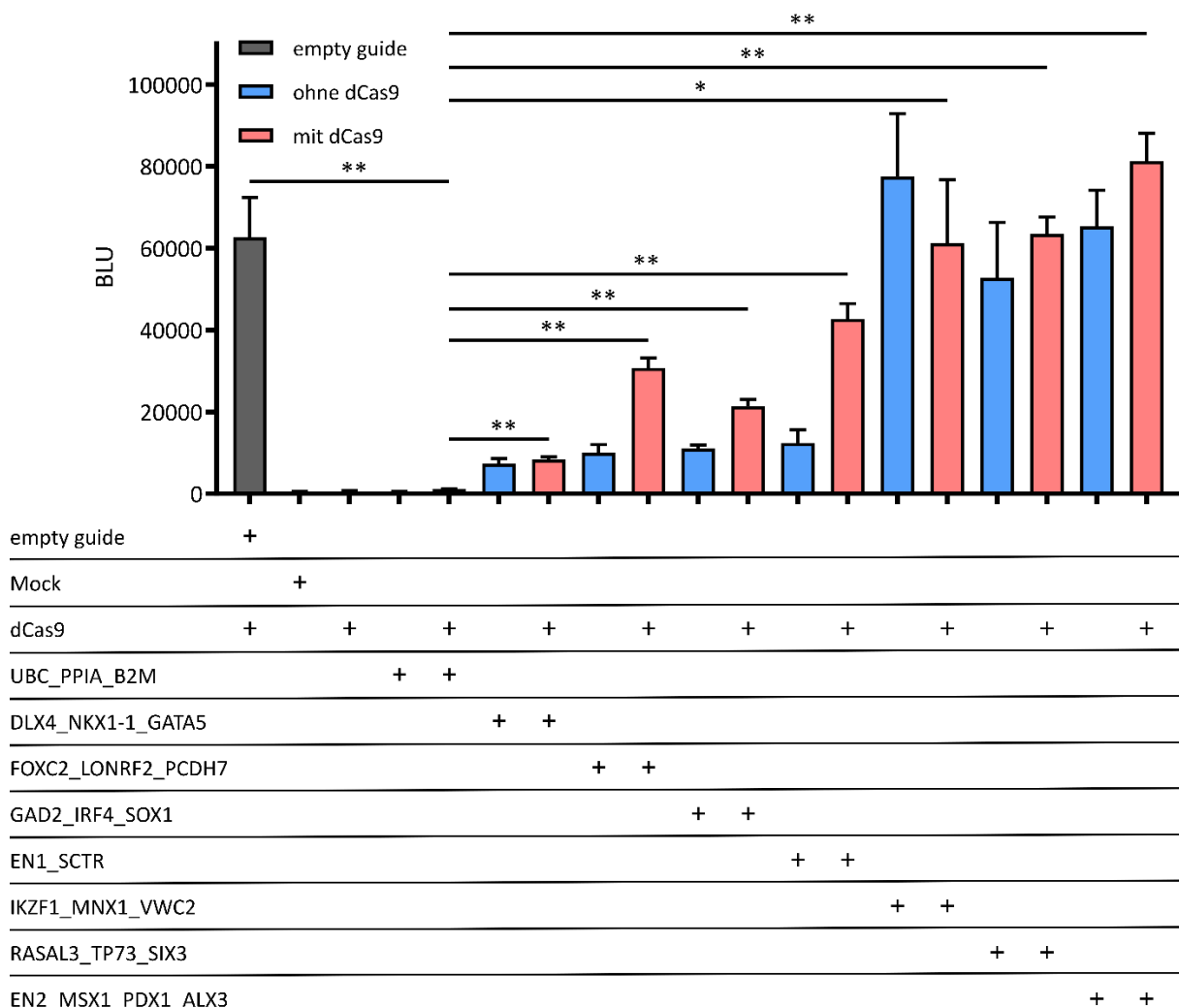


Abbildung 16: Implementierung hypermethylierter Biomarker-Kandidaten in das Reportersystem. Angegebene Plasmide werden auf weißen 96-Well Platten in HCT116 WT transfiziert. Messung der Biolumineszenz erfolgt 48 h nach Transfektion, 20 min nach Substratzugabe (Promega Live Cell Assay). Die oben aufgeführten Konstrukte werden wie folgt verkürzt benannt: dCas9 = dCas9_Key_N-Intein_TEVp61-242aa; die Genpanels (z. B. *EN1_SCTR*) = MBD_Cage_Latch_C-Intein_TEVp3-70aa&flipNluc&sgRNA. Signifikanzniveaus werden jeweils verglichen mit der Ko-Transfektion der Konstrukte dCas9 & *UBC_PPIA_B2M* (unmethylierte Kontrolle) angegeben (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Fehlerbalken repräsentieren die SD.

Aufgrund dieser Ergebnisse soll untersucht werden, inwieweit die flipNluc bereits durch das MBD-Konstrukt allein oder durch einzelne splitTEVp-Bestandteile aktiviert werden kann. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die nicht konstante Induktion bei Kombination beider Konstrukte und damit einhergehender Hintergrundlumineszenz der flipNluc sein.

3.2.2 Keine unspezifische Aktivierung der flipNluc durch das MBD-Konstrukt

Im Folgenden wird untersucht, ob durch das MBD-Konstrukt allein (mit TEVp3-70aa) Lumineszenz der flipNluc induziert wird. Die entsprechenden Plasmide werden hierfür in HCT116 WT transfiziert. Sie enthalten keine sgRNA, sodass dCas9 keine spezifische DNA-Bindung eingehen kann.

Wie aus **Abbildung 17 A** ersichtlich, erfolgt keine Aktivierung der flipNluc durch das MBD-Einzelkonstrukt. Die Kombination aus MBD- und dCas9-Konstrukt weist im Vergleich mit der Hintergrundlumineszenz sogar ein eher geringeres Signal auf ($p = 0,14$). Ein ähnliches Bild zeigt sich erwartungsgemäß bei Verwendung des kombinierten Plasmids, das neben dem MBD-Konstrukt auch die flipNluc kodiert, wie es bei dem vorgestellten Reportersystem zum Einsatz kommt. Auch hier ist keine Signalinduktion vorhanden (vgl. **Abbildung 17 B**).

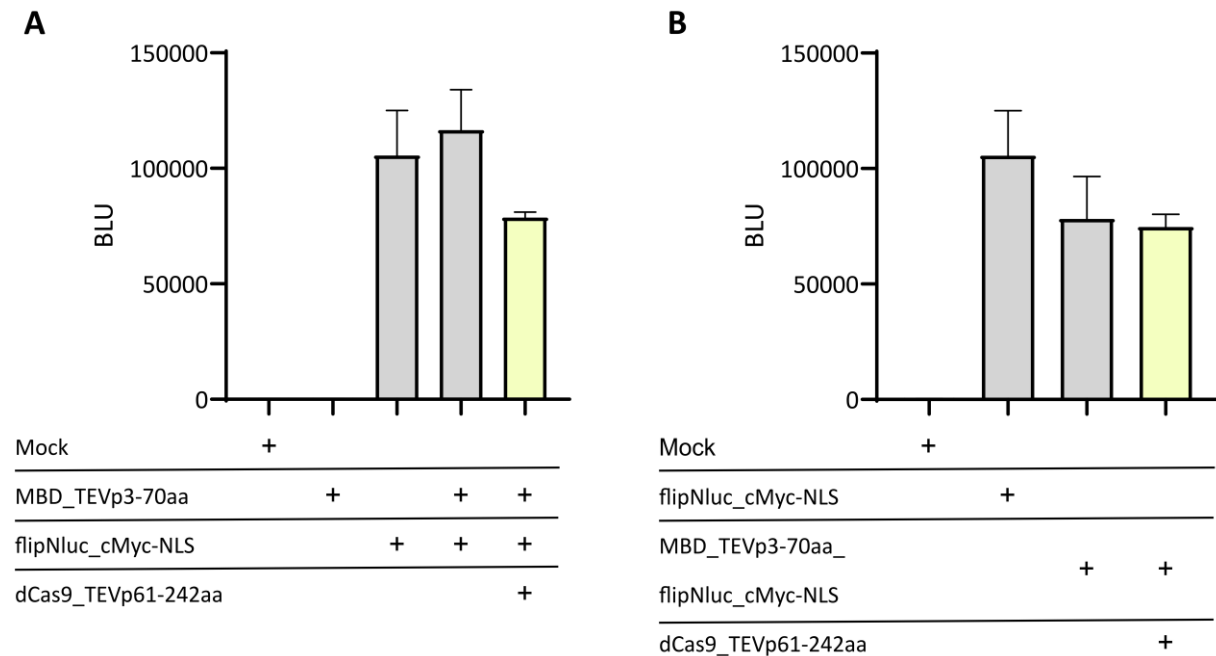


Abbildung 17: Induktion der flipNluc durch das MBD-Konstrukt. (A) Induktion der flipNluc durch das MBD-Konstrukt allein sowie in Kombination mit dCas9-Konstrukt. **(B)** Hintergrundlumineszenz des kombinierten MBD-flipNluc-Konstrukts verglichen mit flipNluc und ausbleibende Induktion bei Kombination mit dCas9-Konstrukt. Plasmide werden auf weißen 96-Well Platten in HCT116 WT transfiziert. Die Lumineszenzmessung erfolgt 48 h nach Transfektion, 20 min nach Substratzugabe (Promega Live Cell Assay). Fehlerbalken repräsentieren die SD ($n = 1$).

3.2.3 Freisetzung der splitTEV-Protease durch Intein-Splicing

Die oben demonstrierte schwache Induktion trotz Vorhandensein beider Konstrukte (MBD & dCas9) und somit beider splitTEVp-Fragmente könnte auf insuffizientes Intein-Splicing zurückzuführen sein. Damit würde eine rekonstituierte, aktive TEV-Protease fehlen, sodass keine Spaltung und demnach keine Aktivierung der flipNluc erfolgen kann. Daher wird die Effizienz dieses Prozesses untersucht. Hierfür erhalten die Plasmide der splitTEVp-Fragmente anstelle des MBD- bzw. dCas9-Konstrukts im Reportersystem den N- bzw. C-terminalen Teil des Fluoreszenzproteins mNG (*mNeonGreen*). Sie fungieren als Exteine und werden bei erfolgreichem Intein-Splicing zu intaktem mNG ligiert. Dieses kann durch Fluoreszenz nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$ bei $\lambda_{\text{em_max}} = 517 \text{ nm}$ detektiert werden. Unterbleibt das Intein-Splicing hingegen, liegt kein funktionsfähiges mNG vor. Gemessene Fluoreszenz ermöglicht daher die Abschätzung des erfolgten Intein-Splicing-Prozesses. Dieses Prinzip wird in **Abbildung 18 A** schematisch dargestellt.

Die Messung ergibt eine signifikante Fluoreszenz beim Einsatz von *TEVp61-242aa_NLS_C-Intein41-1_C-mNG* und *TEVp3-70aa_NLS_N-Intein41-1_N-mNG* (vgl. **Abbildung 18 B**). Ebenso wird die Ligation des mNG durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HCT116 WT Zellen verdeutlicht. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der lediglich *TEVp61-242aa_NLS_C-Intein41-1_C-mNG* transfiziert wird (vgl. **Abbildung 18 C**), weisen Zellen nach Ko-Transfektion von *TEVp61-242aa_NLS_C-Intein41-1_C-mNG* und *TEVp3-70aa_NLS_N-Intein41-1_N-mNG* eine deutliche Fluoreszenz auf (vgl. **Abbildung 18 D**). Aufgrund dieser Daten ist demnach von einem erfolgreichen Intein-Splicing auszugehen, wodurch der rekonstituierte Komplex aus splitTEVp-Intein freigesetzt wird. Die Funktionstüchtigkeit dieser zusammengesetzten splitTEV-Protease muss in nachfolgenden Versuchen noch bestätigt werden.

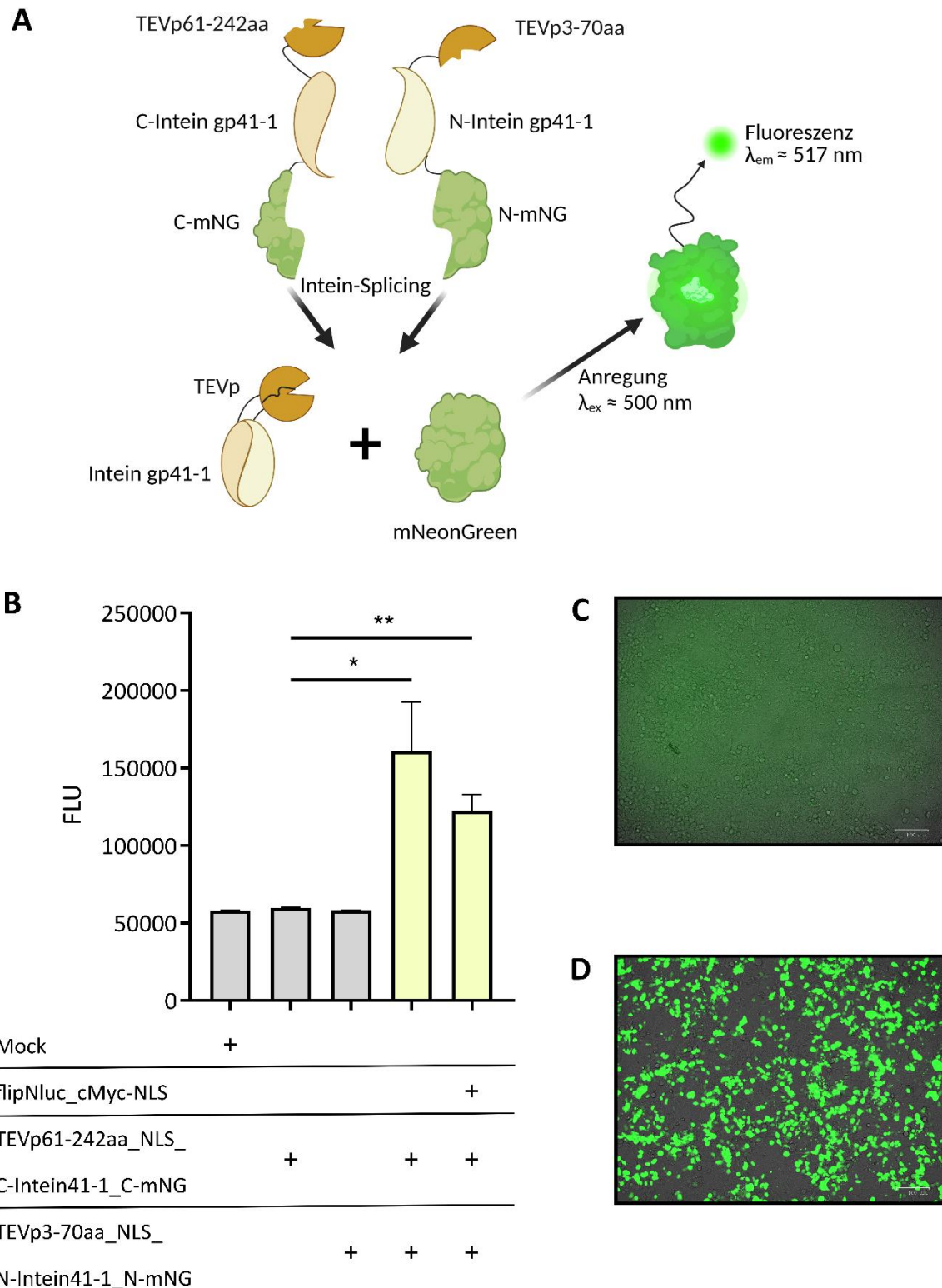


Abbildung 18: Intein-Splicing führt zur Freisetzung der splitTEV-Protease. (A) Prinzip Intein-Splicing: Sind beide Konstrukte (sowohl C-Intein als auch N-Intein) in räumlicher Nähe vorhanden, kommt es zum Intein-Splicing. Die Exteine (hier: C- & N-Terminus des mNeonGreen) werden abgespalten und ligiert. Mittels Fluoreszenzmessung kann nun das Signal von mNG detektiert werden. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt. **(B)** Fluoreszenz von mNG, gemessen 48 h nach Transfektion der Plasmide in HCT116 WT auf schwarzen 96-Well Platten. Fehlerbalken repräsentieren die SD (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). **(C)** Fluoreszenzmikroskopie 48 h nach Transfektion von *TEVp61-242aa-NLS_C-Intein41-1_C-mNG* in HCT116 WT zeigt im Vergleich zur Ko-Transfektion **(D)** von *TEVp61-242aa-NLS_C-Intein41-1_C-mNG* & *TEVp3-70aa-NLS_N-Intein41-1_N-mNG* keine Fluoreszenz, da kein vollständiges mNeonGreen vorliegt.

3.2.4 Modifiziertes splitTEVp-Intein-Konstrukt induziert flipNluc effizienter

In einem weiteren Schritt wird zunächst geprüft, inwieweit Einzelteile der splitTEV-Protease (TEVp3-70aa & TEVp61-242aa) in der Lage sind, flipNluc an der TEV-Erkennungssequenz zu spalten. Tatsächlich wird durch die Bestandteile TEVp3-70aa (1,51-faches Signal; SD = 0,17) respektive TEVp61-242aa (2,21-fach; SD = 0,18) allein bereits Lumineszenz induziert (vgl. **Abbildung 19**). Auch die Kombination beider splitTEVp-Fragmente zeigt eine Aktivierung der flipNluc (2,21-fach; SD = 0,17). Diese ist damit jedoch nicht stärker als diejenige der TEVp61-242aa allein. Somit zeigt sich insbesondere im Vergleich zur 35,15-fachen Induktion (SD = 1,15) der vollständigen Protease (TEVp1-242aa) keine suffiziente Aktivierung der flipNluc. Ebenfalls wird hiermit untersucht, ob die Position des kovalent gebundenen split-Inteins an TEVp die Funktion der Protease beeinträchtigen kann. Die Kombination aus splitTEVp und Intein (Variante 1) bietet diesbezüglich nur eine schwache Induktion der flipNluc.

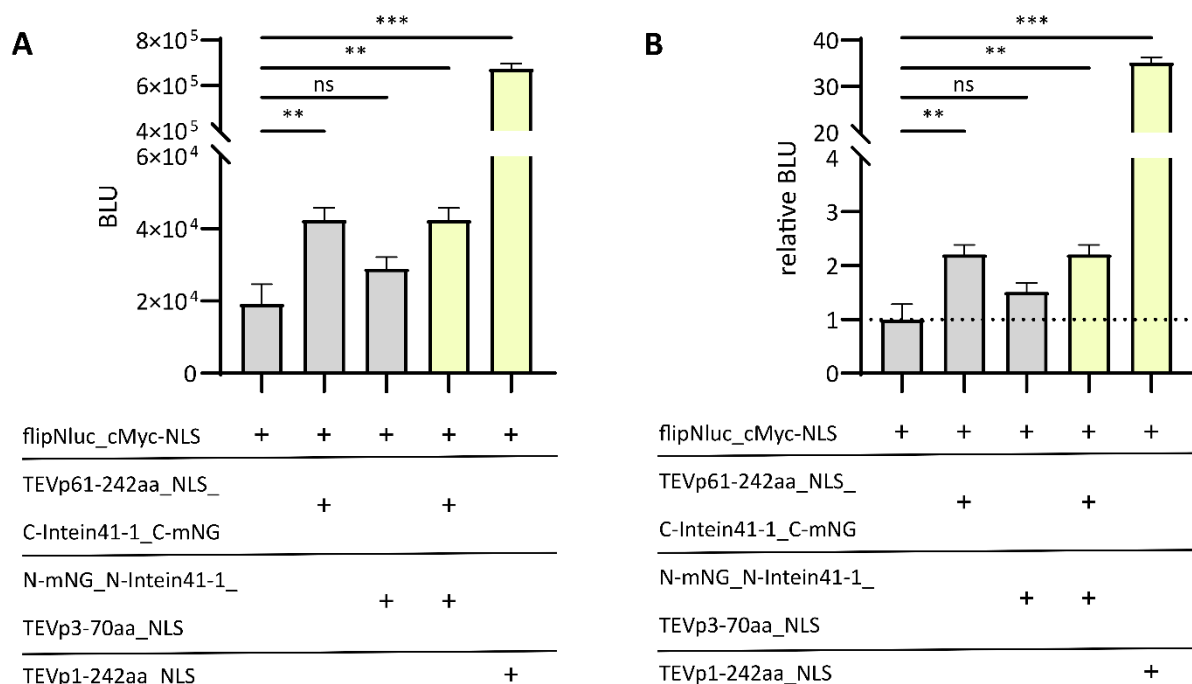


Abbildung 19: Induktion der flipNluc durch splitTEVp-Intein (Variante 1). (A) Absolute Biolumineszenz der flipNluc bei Induktion mittels splitTEVp-Intein-Konstrukt (Variante 1). (B) Relative Induktion angegeben als Vielfaches des flipNluc-Hintergrundsignals. Gepunktete Linie bei $y = 1$ dient als Referenz. Plasmide werden auf schwarzen 96-Well Platten in HCT116 WT transfiziert. Die Lumineszenzmessung erfolgt 48 h nach Transfektion, 20 min nach Substratzugabe (Promega Live Cell Assay). Fehlerbalken repräsentieren die SD (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Um die Effizienz der flipNluc-Induktion durch die splitTEVp-Intein-Einheit zu optimieren, erfolgte ein Umbau des Konstrukts. In Variante 2 ist der Linker zum Intein mit dem C-Terminus der TEVp3-70aa statt mit dem N-Terminus verbunden. An TEVp61-242aa befindet sich der

Linker in Variante 2 hingegen N- statt C-terminal. Lediglich die Kernlokalisierungssignale SV40 & cMyc sind noch am C-Terminus positioniert. Ausschnitte der Plasmidkarten sowie eine schematische Darstellung der Konstruktvariation findet sich in **Abbildung 20**.

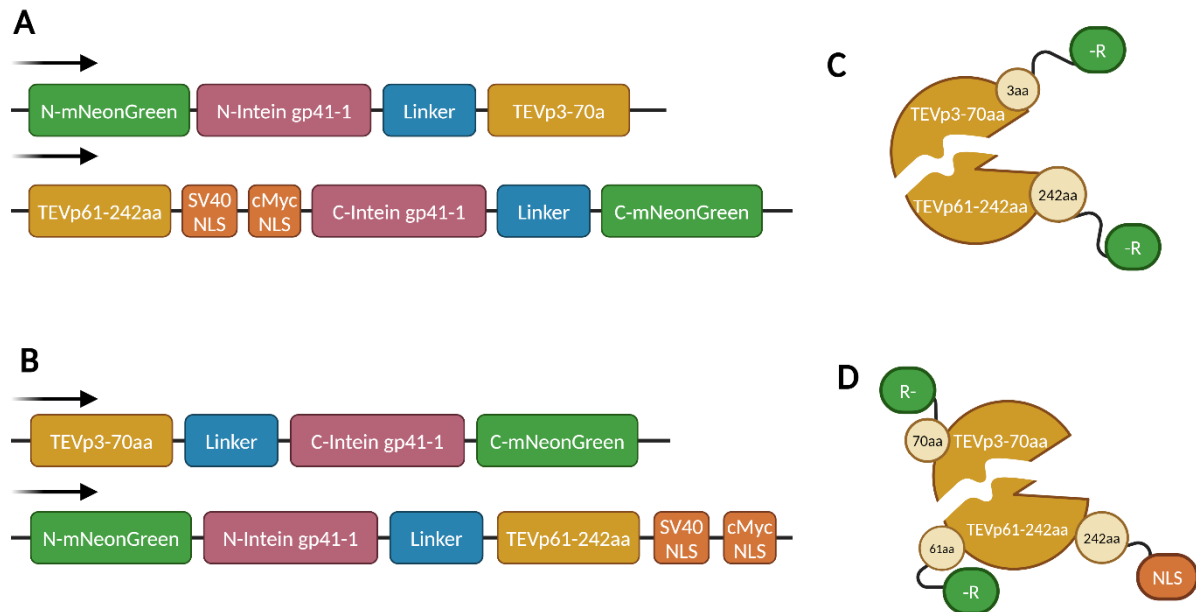


Abbildung 20: splitTEVp-Intein-Variation. Ausschnitt der Plasmidkarten von **(A)** Variante 1 sowie **(B)** Variante 2 der splitTEVp-Intein-Konstrukte. Der Pfeil gibt jeweils die Syntheserichtung an. **(C)** Schematische Darstellung der splitTEV-Protease und der Bindestellen des restlichen Konstrukts (-R) von Variante 1 und **(D)** Variante 2. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

Die Messergebnisse des modifizierten Systems belegen für die Kombination beider splitTEVp-Intein-Bestandteile eine hochsignifikante Induktion der flipNluc (vgl. **Abbildung 21 A-B**). Es handelt sich um einen 22,99-fachen relativen Signalzuwachs ($SD = 1,74$). Dieser Signalzuwachs entspricht ungefähr dem der vollständigen TEVp1-242aa. Das Einzelfragment TEVp61-242aa führt in Variante 2 zu einem 2,17-fachen ($SD = 0,18$), TEVp3-70aa zu einem 1,5-fachen ($SD = 0,27$) relativen Signalanstieg. Die Modifikation des Konstrukts ermöglicht bei Ko-Transfektion somit eine effizientere Spaltung der flipNluc und damit die spezifische Induktion von Lumineszenz. Dabei liegt die Signalintensität sowohl deutlich über der Hintergrundaktivität von flipNluc als auch über der unspezifischen Induktion durch splitTEVp-Einzelfragmente. Ferner wird analog zu Abschnitt 3.2.3 bestätigt, dass auch für Variante 2 von splitTEVp-Intein ein erfolgreiches Intein-Splicing gegeben ist (vgl. **Abbildung 21 C**). Hierbei wird das rekonstituierte splitTEVp-Intein freigesetzt und ermöglicht die oben beschriebene signifikante Aktivierung der flipNluc.

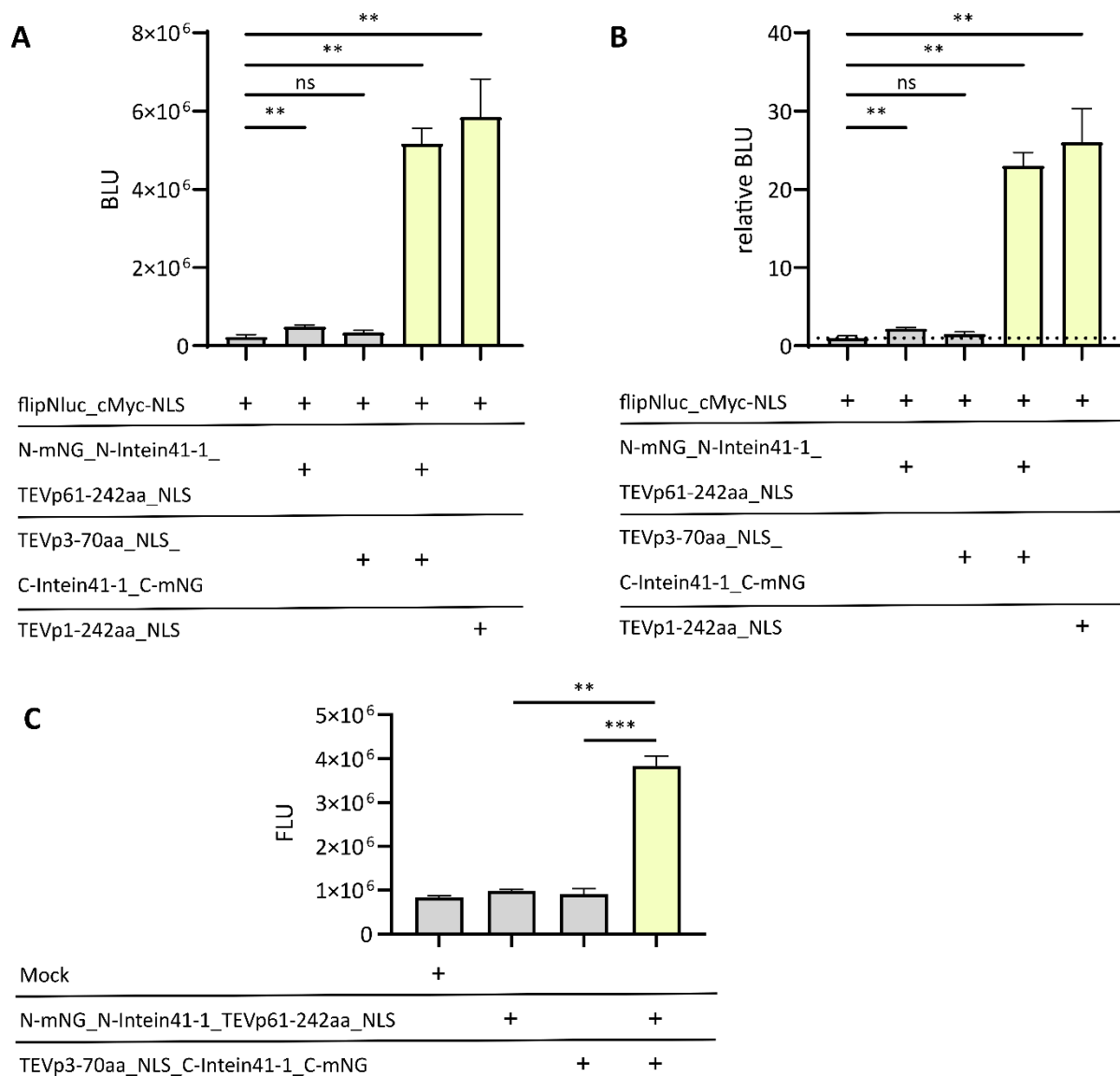


Abbildung 21: Induktion der flipNluc durch splitTEVp-Intein (Variante 2). (A) Absolute Biolumineszenz der flipNluc bei Induktion mittels splitTEVp-Intein-Konstrukt (Variante 2). (B) Relative Induktion angegeben als Vielfaches des flipNluc-Hintergrundsignals. Gepunktete Linie bei $y = 1$ dient als Referenz. (C) Fluoreszenz von mNG zeigt erfolgreiches Intein-Splicing. Plasmide werden auf schwarzen 96-Well Platten in HCT116 WT transfiziert. Die Messung erfolgt 48 h nach Transfektion und bei flipNluc 20 min nach Substratzugabe (Promega Live Cell Assay). Fehlerbalken repräsentieren die SD (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

3.2.5 Modifiziertes splitTEVp-Intein-Konstrukt zur Optimierung des Reportersystems

Aufgrund der deutlich verbesserten Fähigkeit, die flipNluc zu induzieren, soll das modifizierte splitTEVp-Intein-Konstrukt auch für das Methylierungsreportersystem genutzt werden. Hierfür wird zunächst die Bindestelle des restlichen MBD-Konstrukts von Position 3aa der TEV-Protease durch Position 70aa ersetzt und beispielhaft für einige hypermethylierte Gene umkloniert. Nach dieser Änderung führt die gleichzeitige Transfektion sowohl des dCas9- als auch des MBD-Konstrukts in die Krebszelllinie HCT116 WT verglichen mit alleiniger

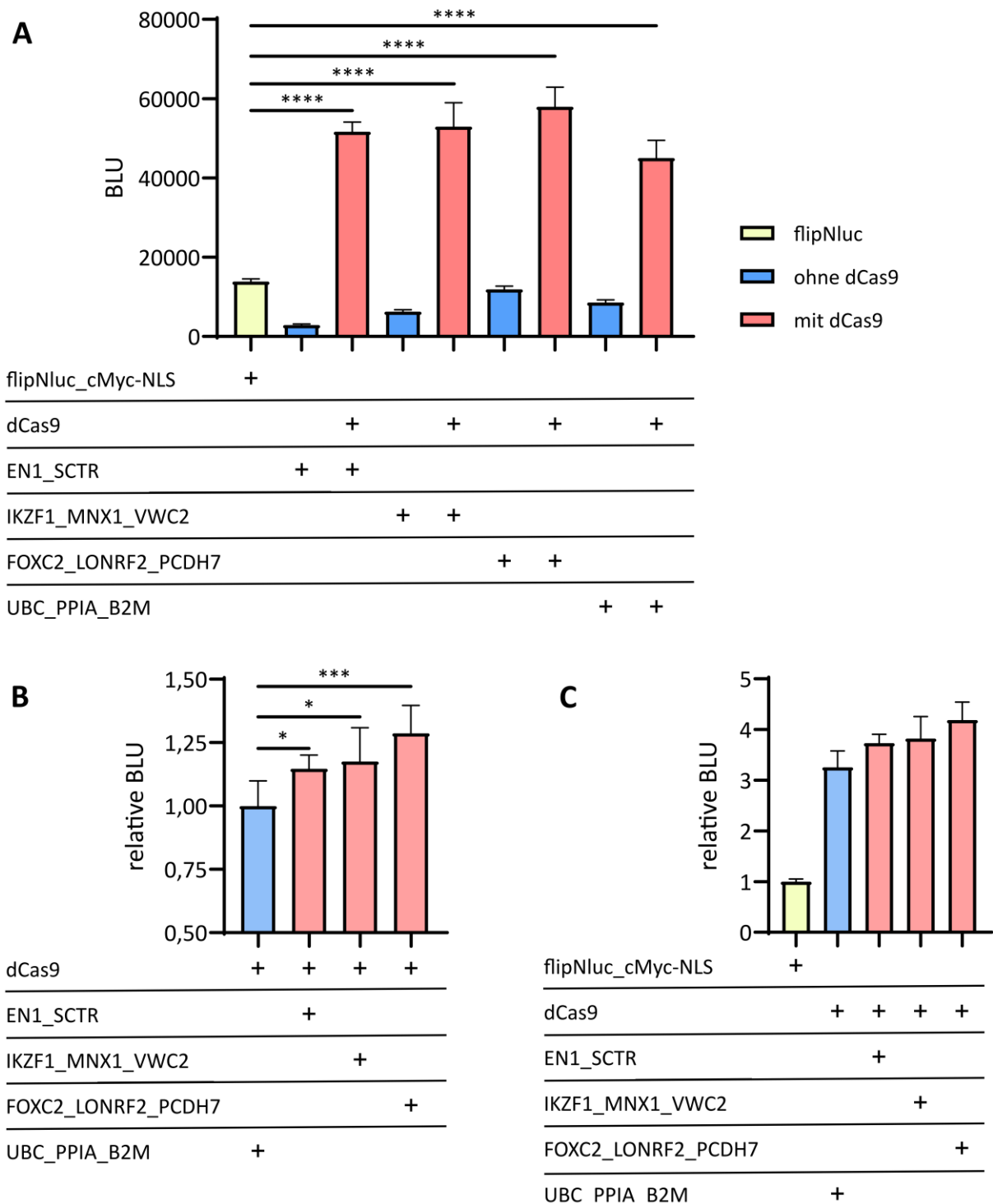


Abbildung 22: Optimierte Reportersystem detektiert hypermethylierte Biomarker. (A) Absolute Lumineszenz der flipNluc ist innerhalb des kombinierten Reportersystems gegenüber dem Hintergrundsignal der flipNluc signifikant erhöht. **(B)** Relatives Signal hypermethylierter Biomarkerpanels im Verhältnis zur unmethylierten Kontrolle *UBC_PPIA_B2M*. **(C)** Relative Induktion der flipNluc durch das Reportersystem bzw. die freiwerdende splitTEV-Protease. Angegebene Plasmide werden auf weißen 96-Well Platten in HCT116 WT transfiziert. Messung der Biolumineszenz erfolgt 48 h nach Transfektion, 1 h nach Substratzugabe (Endurazin). Versuchsdurchführung mit sechs technischen Replikaten ($n = 1$). Die oben aufgeführten Konstrukte werden wie folgt verkürzt benannt: dCas9 = dCas9_Key_N-Intein_TEVp61-242aa; die Genpanels (z. B. *EN1_SCTR*) = TEVp3-70aa_C-Intein_Latch_Cage_MBD&flipNluc&sgRNA. Fehlerbalken repräsentieren die SD (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

Transfektion des MBD-Plasmids zu deutlich stärkeren Signalen (vgl. **Abbildung 22 A**). Dieses

Ergebnis stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber der ursprünglichen Variante des Reportersystems dar, bei welcher die im MBD-Konstrukt enthaltene flipNluc ein signifikantes Hintergrundsignal ausweist (vgl. Kapitel 3.2.1). Die relative Induktion bei Ko-Transfektion wird für *EN1_SCTR*, *IKZF1_MNX1_VWC2*, *FOXC2_LONRF2_PCDH7* sowie die Kontrollgruppe *UBC_PPIA_B2M* in **Tabelle 14** gegenübergestellt. Die rekonstituierte splitTEV-Protease in Variante 2 ist demnach in der Lage, die flipNluc deutlich effizienter zu induzieren.

Tabelle 14: Relative Induktion der flipNluc bei Ko-Transfektion von MBD- & dCas9-Konstrukt. Angegeben wird jeweils der relative Unterschied zwischen der Lumineszenz bei alleiniger Transfektion des MBD-Konstrukts mit enthaltener flipNluc und der Ko-Transfektion bei Kombination mit dCas9-Konstrukt.

	Variante 1 [relative BLU]	Variante 2 [relative BLU]
EN1_SCTR	3,44 (SD = 0,3)	17,91 (SD = 0,85)
IKZF1_MNX1_VWC2	0,79 (SD = 0,2)	8,49 (SD = 0,97)
FOXC2_LONRF2_PCDH7	3,06 (SD = 0,24)	4,89 (SD = 0,42)
UBC_PPIA_B2M	2,39 (SD = 0,17)	5,28 (SD = 0,52)

Darüber hinaus weisen die untersuchten hypermethylierten Genloci bei Detektion durch das optimierte Reportersystem auch im Vergleich mit der unmethylierten Kontrolle *UBC_PPIA_B2M* ein signifikant höheres Signal auf (vgl. **Abbildung 22 B**). Dies ermöglicht die Differenzierung von malignem Gewebe anhand unterschiedlicher Methylierungsniveaus. Ebenso lässt sich zeigen, dass die gemessene Lumineszenz bei Verwendung des Reportersystems deutlich über dem Hintergrundsignal einer allein transfizierten flipNluc liegt (vgl. **Abbildung 22 C**).

3.3 Bindet dCas9 bevorzugt innerhalb unmethylierter Regionen?

Die Funktion des Methylierungsreportersystems erfordert eine effektive und spezifische Bindung des dCas9-Konstrukts an den vorgesehenen DNA-Locus. Daher wird mithilfe einer Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) überprüft, inwieweit die Interaktion zwischen dCas9 und DNA vom Methylierungsstatus der genomischen Region abhängig ist. Hierfür wird ein Antikörper eingesetzt, welcher gegen Cas9 gerichtet ist (vgl. Kapitel 2.5). Hypermethylierte Loci werden am Beispiel der Gene *EN1* & *SCTR*, unmethylierte Regionen am Beispiel von *GAPDH* & *GPI* untersucht. Für jede der drei durch die sgRNA vorgesehenen dCas9-Bindestellen pro Zielgen wird ein qPCR-Primerpaar eingesetzt. 48 h nach transienter Transfektion der Plasmide wird die DNA der KRK-Zelllinie HCT116 extrahiert. Im Folgenden wird das Plasmid, welches neben dem MBD-Konstrukt auch die sgRNA (von *EN1* & *SCTR* bzw. *GAPDH* & *GPI*)

sowie die flipNluc enthält, verkürzt als „*sgRNA*“ bezeichnet. „*dCas9*“ steht für das dCas9-Konstrukt des Reportersystems. Bei der Evaluation der Fragmentlänge mittels PCR nach Chromatinfragmentierung zeigt sich für sämtliche Proben ein inhomogenes Bild mit Peaks bei > 4 kb, was eine Abweichung von den im Herstellerprotokoll geforderten Bedingungen (Länge < 1 kb) darstellt. Obwohl dies das Auflösungsvermögen beeinträchtigen kann, werden folgend die Ergebnisse der ChIP dargestellt.

Bei Einzelbetrachtung untersuchter Genregionen fällt das Hintergrundsignal der Solo-Transfektion von *sgRNA* auf. Obwohl hierbei kein dCas9-Plasmid eingebracht wird, kann im Rahmen der ChIP eine Protein-DNA-Interaktion registriert werden. Ferner wird in methylierten Regionen eine stärkere relative Bindung für die unspezifische dCas9-Interaktion gemessen als für die Ko-Transfektion von *sgRNA* und *dCas9* (vgl. **Abbildung 23 A-B**). Prinzipiell wäre das Gegenteil zu erwarten, da nur bei Vorhandensein beider Konstrukte von einer stabilen Protein-DNA-Interaktion ausgegangen wird. Aufgrund von Ausreißern wird zudem bei Ko-Transfektion der Konstrukte jeweils ein Wert für die untersuchten Genloci *SCTR_2*, *SCTR_3* sowie *GAPDH_3* ausgeschlossen.

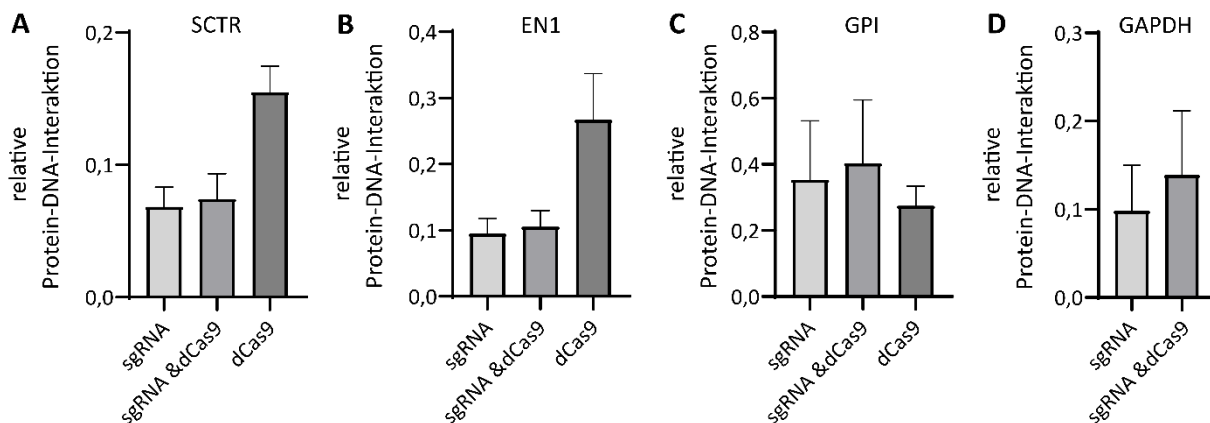


Abbildung 23: Bindung der dCas9 an Genloci *SCTR*, *EN1*, *GPI* & *GAPDH*. (A)-(D) zeigen die Bindung der dCas9 jeweils innerhalb dreier Loci der Gene *SCTR*, *EN1*, *GPI* und *GAPDH*. Die relative Bindung ist jeweils für die alleinige Transfektion von *sgRNA* (ohne dCas9-Konstrukt), die Ko-Transfektion von *sgRNA* und *dCas9* sowie für die alleinige Transfektion von *dCas9* angegeben. Die Ernte der Zellen HCT116 WT erfolgt 48 h nach Transfektion der Plasmide. Ergebnisse der (ChIP-)qPCR werden auf die Menge des eingesetzten Materials normalisiert und bezüglich einer Positivkontrolle relativiert. Aufgrund von Ausreißern wird für die Genloci *SCTR_2*, *SCTR_3* & *GAPDH_3* jeweils ein Wert der Ko-Transfektion „*sgRNA* & *dCas9*“ ausgeschlossen. Fehlerbalken zeigen den SEM.

Für die unspezifische dCas9-DNA-Bindung, also bei Einzeltransfektion des dCas9-Konstrukts ohne *sgRNA*, beträgt der Mittelwert der relativen Protein-DNA-Interaktion für methylierte Regionen 0,21 (SD = 0,12), für unmethylierte 0,27 (SD = 0,12). Es zeigt sich demnach kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,2$) hinsichtlich einer Bevorzugung unmethylierter DNA-Abschnitte im Rahmen unspezifischer dCas9-Bindung (vgl. **Abbildung 24 A**).

Bei Ko-Transfektion von *sgRNA* weisen methylierte Loci eine relative Protein-DNA-Bindung von 0,09 (SD = 0,03), unmethylierte eine relative Protein-DNA-Bindung von 0,27 (SD = 0,26) für die spezifische dCas9-DNA-Interaktion auf. Zwar entspricht dies formal einer statistisch signifikanten Differenz ($p = 0,01$), jedoch ist die große SD insbesondere für unmethylierte Regionen zu berücksichtigen (vgl. **Abbildung 24 B**). Auch hier wird bei der Ko-Transfektion von *sgRNA* und *dCas9* jeweils ein Wert für die untersuchten Genloci *SCTR_2*, *SCTR_3* sowie *GAPDH_3* ausgeschlossen.

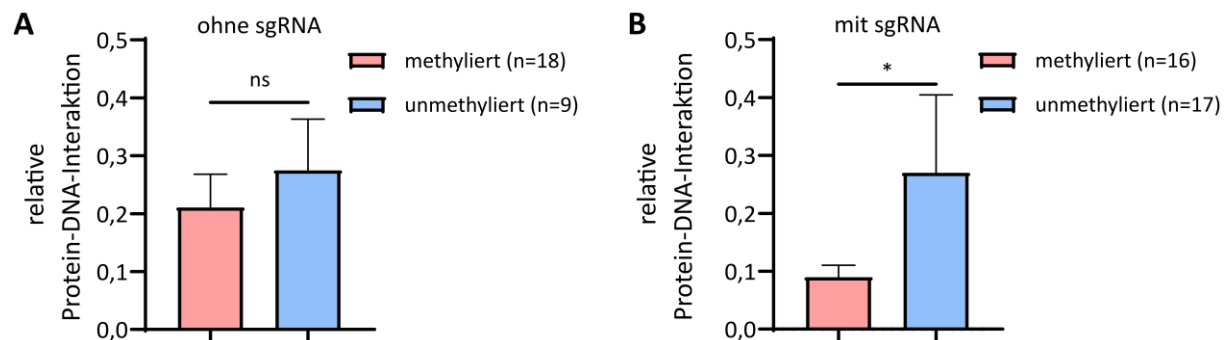


Abbildung 24: Bindung der dCas9 an methylierte & unmethylierte Genloci. (A) Zeigt die unspezifische Bindung der dCas9 ohne Vorhandensein einer *sgRNA* nach Solo-Transfektion des dCas9-Konstrukts, (B) die spezifische Bindung der dCas9 nach Ko-Transfektion mit *sgRNA*. Die Subgruppe „methyliert“ schließt jeweils drei Genloci innerhalb der Gene *SCTR* sowie *EN1*, die Subgruppe „unmethyliert“ drei Loci innerhalb von *GPI* und *GAPDH* ein. Hierbei handelt es sich um die Zielregionen der *sgRNA* des Methylierungsreporters. Die Ernte der Zellen HCT116 WT erfolgt 48 h nach Transfektion der Plasmide. Ergebnisse der (ChIP-)qPCR werden auf die Menge des eingesetzten Materials normalisiert und bezüglich einer Positivkontrolle relativiert. Mit n ist jeweils die Anzahl der enthaltenen Werte angegeben. Fehlerbalken repräsentieren die SD (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$).

3.4 Triple Caspase Aktivitätsassay

3.4.1 Transfektion der Einzelsysteme zur real-time Detektion der Caspasen-3, -8 & -9

Vor der Etablierung eines *Triple Caspase (Aktivitäts-)Assays* (TCA) werden zunächst einzelne Reporter auf ihre Fähigkeit geprüft, die Caspasen-3, -8 und -9 zu detektieren. Hierfür erfolgt die Klonierung der jeweiligen *Cleavage Site* (vgl. **Tabelle 15**) in Einzelreporter. Entsprechende Plasmide werden in HCT116 WT transfiziert und der Zelltod mittels Wirkstoffzugabe induziert. Zur Einleitung der Apoptose werden der Fas-Ligand, Panobinostat, ABT-199 sowie Staurosporin in angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 15: Erkennungssequenz zur Detektion der Caspasen.

	Erkennungssequenz
Caspase-3	DEVDG
Caspase-8	IETD
Caspase-9	LEHD

Sowohl bei Detektion der Caspase-3 (vgl. **Abbildung 25 A**) als auch der Caspase-8 (vgl. **Abbildung 25 B**) weist die flipNluc verglichen mit der Kontrollbedingung ohne Therapieinduktion einen relativen Signalanstieg auf. Dieser repräsentiert die hohe Caspasen-Aktivität im Rahmen der Apoptose vor allem innerhalb der ersten 8,5 h nach Wirkstoffzugabe. Beide Reporter scheinen daher für die Verwendung innerhalb des TCA geeignet. Nachfolgend wird die flipNluc zur Messung der Caspase-8 eingesetzt.

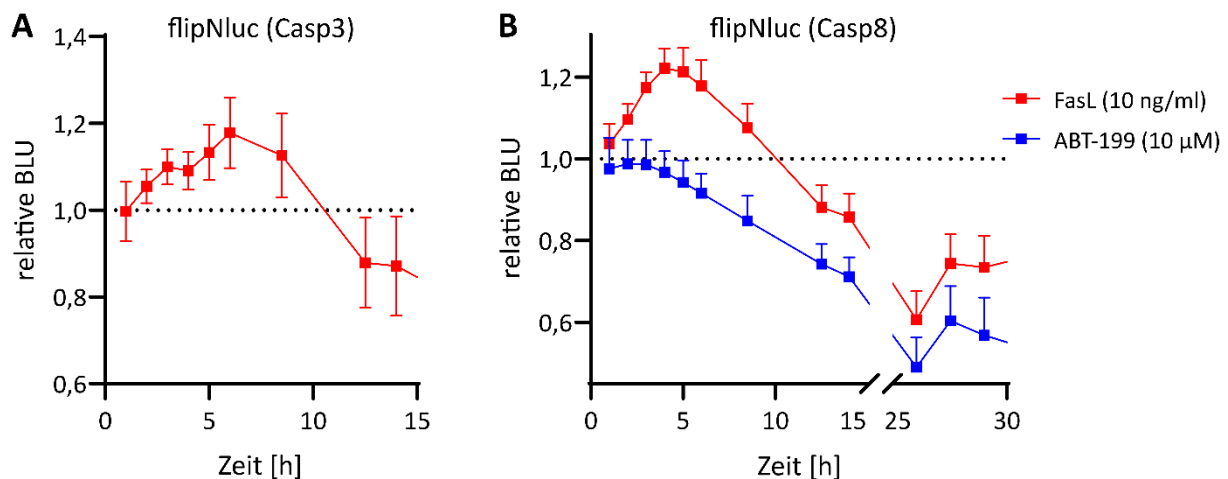


Abbildung 25: flipNluc als Caspase-Reporter. (A) Caspase-3 induziert durch *Cleavage* von flipNluc (Casp3), (B) Caspase-8 durch *Cleavage* von flipNluc (Casp8) Lumineszenz. Die Therapieinduktion mit rekombinantem Fas-Liganden ($10 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$) erfolgt in Kombination mit Anti-polyHistidin ($10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) 48 h nach Transfektion der Reporterplasmide in HCT116 WT auf weißen 96-Well Platten. Vor Zugabe der Therapeutika wird zum Zeitpunkt $t = 0$ h ein Normalisierungsfaktor ermittelt. Zu jedem Messzeitpunkt werden Werte entsprechend normalisiert sowie bezogen auf den Mittelwert der Kontrollbedingung ohne erfolgte Therapieinduktion relativiert. Die gepunktete Linie $y = 1$ gilt als Referenz für diese Kontrollbedingung. Fehlerbalken repräsentieren die SD, bei Graphen mit mehreren Therapeutika werden sie zur besseren Übersichtlichkeit nur nach oben angegeben. Durchführung in sechs technischen Replikaten ($n = 1$).

Zur Aktivitätsbestimmung der Caspasen-3 und -9, werden die induzierbaren Fluoreszenzproteine flipEGFP und flip-mNG3A sowie die Luciferase CPFluc herangezogen. Um Caspase-3 zu induzieren und die resultierende Fluoreszenz von flipEGFP (vgl. **Abbildung 26 A**) sowie flip-mNG3A (vgl. **Abbildung 26 B**) zu messen, wird Staurosporin verwendet. Die Induktion von Caspase-9 erfolgt mittels Panobinostat sowie ABT-199 und wird durch die CPFluc (Casp9) detektiert (vgl. **Abbildung 26 C**). Alle drei untersuchten Reporter weisen nach der Apoptose-Induktion einen relativen Signalanstieg auf. Als Kandidaten zur Implementierung eines TCA wird flip-mNG3A für Caspase-3 sowie CPFluc für Caspase-9 herangezogen.

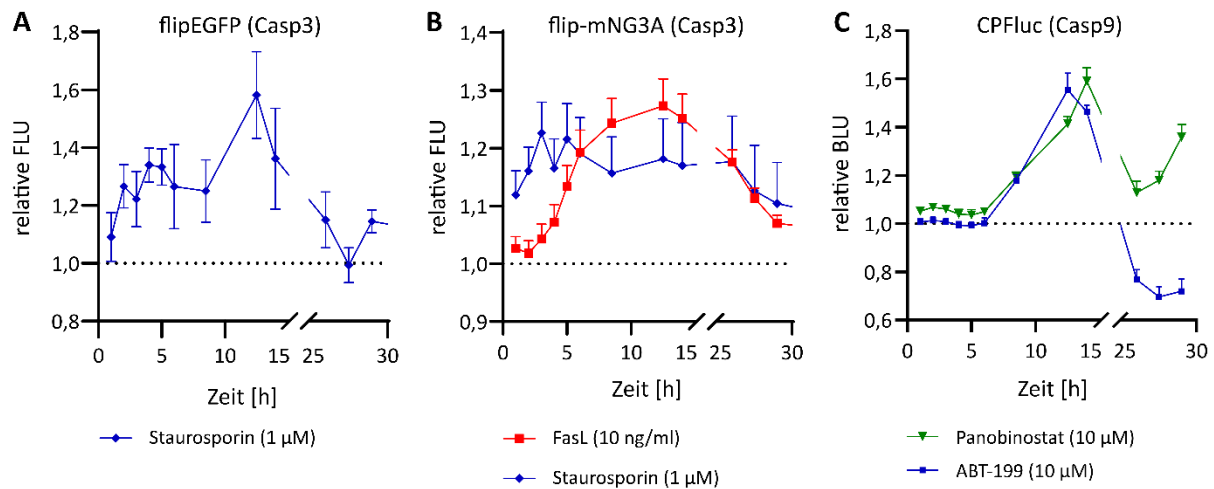


Abbildung 26: Weitere Caspase-Reporter zur Implementierung eines Triple Caspase Assay. Caspase-3 wird in (A) mithilfe des Fluoreszenzproteins flipEGFP (Casp3) gemessen, in (B) mithilfe von flip-mNG3A (Casp3). Der rekombinante Fas-Ligand ($10 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$) wird in Kombination mit Anti-polyHistidin ($10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) verwendet. Zur Detektion von Caspase-9 (C) wird die CPFluc (Casp9) induziert. Die Therapieinduktion erfolgt 48 h nach Transfektion der Reporterplasmide in HCT116 WT auf (A) & (B) schwarzen bzw. (C) weißen 96-Well Platten. Für Messwerte wird vor der Zugabe von Therapeutika zum Zeitpunkt $t=0$ h ein Normalisierungsfaktor ermittelt. Zu jedem Messzeitpunkt werden Werte entsprechend normalisiert sowie bezogen auf den Mittelwert der Kontrollbedingung ohne erfolgte Therapieinduktion relativiert. Die gepunktete Linie $y=1$ gilt als Referenz für diese Kontrollbedingung. Fehlerbalken repräsentieren die SD, bei Graphen mit mehreren Induktionen werden sie zur besseren Übersichtlichkeit nur nach oben angegeben. Durchführung in sechs technischen Replikaten ($n=1$).

3.4.2 Proof of Concept Triple Caspase Aktivitätsassay

Zur Evaluation des TCA werden die Reporter flip-mNG3A (Casp3), flipNluc (Casp8) und CPFluc (Casp9) in HCT116 WT ko-transfiziert. Die Messung beider Luciferasen erfolgt zusammen in einem Well nach Zugabe der Substrate, während die Fluoreszenz von flip-mNG3A in einem separaten Well gemessen wird.

Bei Apoptose-Induktion mittels Fas-Liganden steigt initial vor allem das relative Signal der flipNluc, was auf eine Aktivität von Caspase-8 hinweist. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich zudem ein Anstieg der Fluoreszenz von flip-mNG3A, welche Caspase-3 repräsentiert (vgl. **Abbildung 27 A**). Wird Staurosporin als Therapeutikum eingesetzt, weist bereits ab Messpunkt $t=1$ h flip-mNG3A und somit Caspase-3 das höchste relative Signal bzw. die größte Aktivität auf (vgl. **Abbildung 27 B**). Während der ersten 10 h nach Zugabe von Panobinostat bzw. ABT-199 ist ein leichter Anstieg von flipNluc (Casp8) und CPFluc (Casp9) zu verzeichnen. Ab $t=26$ h zeigt sich ein deutliches Signal für flip-mNG3A (Casp3) (vgl. **Abbildung 27 C-D**). Zusammenfassend scheint das TCA auch in ko-transfizierter Form plausible Messergebnisse zu liefern. Allerdings ist verglichen mit einer Einzeltransfektion der Reporter beispielsweise für

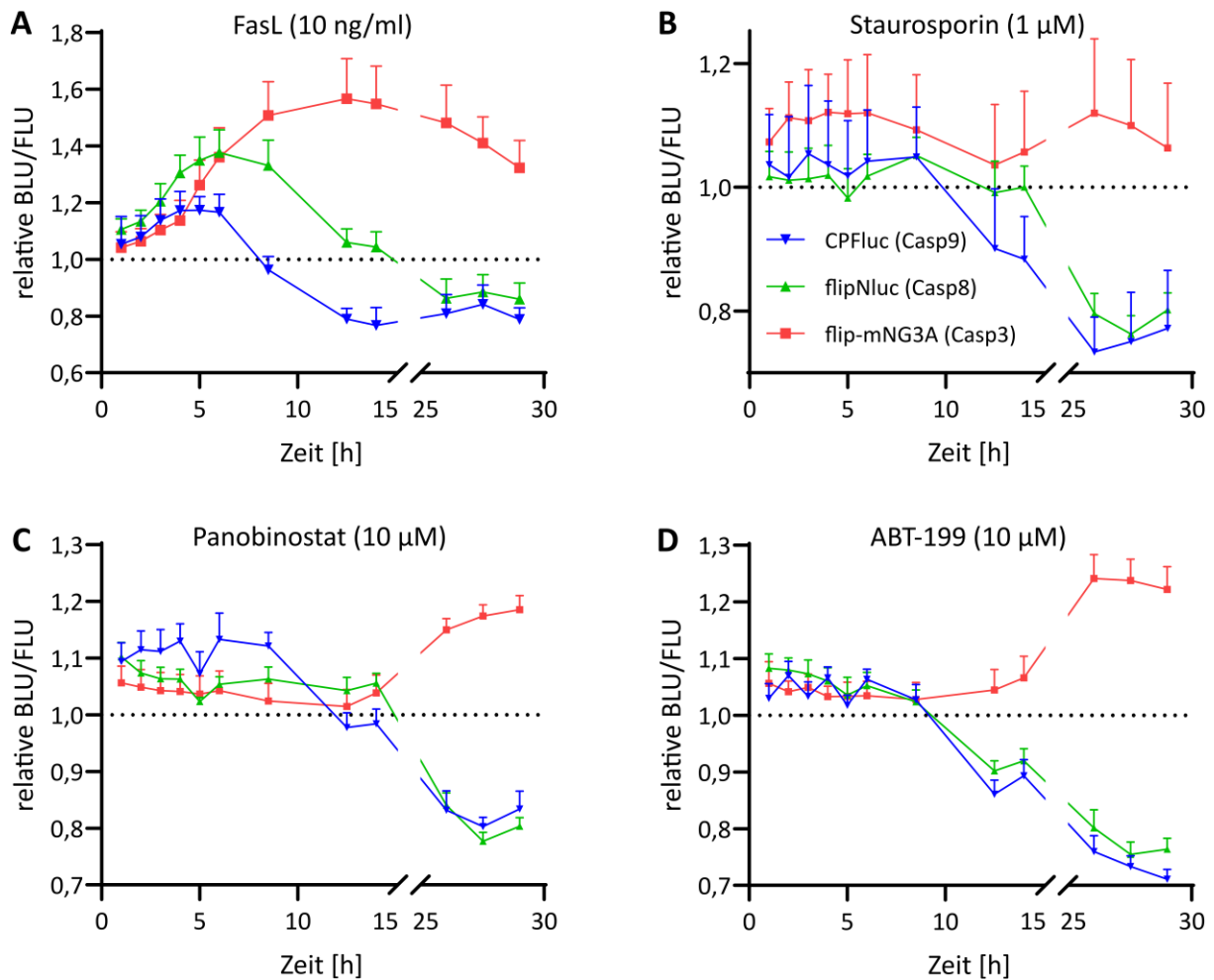


Abbildung 27: Proof of Concept des Triple Caspase Assays. Dargestellt ist das relative Signal der Reportersysteme CPFluc (Casp9, blau), flipNluc (Casp8, grün) sowie flip-mNG3A (Casp3, rot) im zeitlichen Verlauf nach Wirkstoffzugabe. Zur Induktion der Apoptose verwendet werden **(A)** Fas-Ligand ($10 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$) in Kombination mit AntipolyHistidin ($10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$), **(B)** Staurosporin ($1 \mu\text{M}$), **(C)** Panobinostat ($10 \mu\text{M}$) und **(D)** ABT-199 ($10 \mu\text{M}$). Sie erfolgt 48 h nach Transfektion der Reporterplasmide in HCT116 WT auf schwarzen 96-Well Platten. Für Messwerte wird vor der Zugabe von Therapeutika zum Zeitpunkt $t = 0$ h ein Normalisierungsfaktor ermittelt. Zu jedem Messzeitpunkt werden Werte entsprechend normalisiert sowie bezogen auf den Mittelwert der Kontrollbedingung ohne erfolgte Therapieinduktion relativiert. Die gepunktete Linie $y = 1$ gilt als Referenz für diese Kontrollbedingung. Fehlerbalken, zur besseren Übersichtlichkeit nur nach oben angegeben, repräsentieren die SD. Durchführung in sechs technischen Replikaten ($n = 1$).

CPFluc (Casp9) kein eindeutiger Signalanstieg nach Apoptose-Induktion durch Panobinostat sowie ABT-199 festzustellen (siehe insbesondere $t = 14$ h in **Abbildung 26 C** sowie **Abbildung 27 C-D**).

Um den Hintergrundzelltod, der auch ohne Zugabe von Wirkstoffen auftritt, als mögliche Ursache des geringen relativen Anstiegs abschätzen zu können, wird die Kontrollbedingung ohne Therapiezugabe betrachtet. Da das Signal der Reporter jeweils auf diese Kontrolle relativiert wird, könnten hier hohe Signale (ausgelöst durch Apoptose der Zellen) zu niedrigeren relativen Werten führen. Hinsichtlich relativer Signalsteigerung ($t = 1$ h zu

t = 8,5 h) der CPFluc (Casp9) ergibt sich für die Einzeltransfektion der Reporter ein 1,27-facher, für das kombinierte TCA ein 1,87-facher Anstieg. Die flipNluc (Casp8) zeigt ein ähnliches Bild mit 1,8-fachem (Einzelreporter) bzw. 2,1-fachem (TCA) Signalanstieg (vgl. **Abbildung 28**). Aus diesen Ergebnissen lässt sich zwar nicht der absolut auftretende Zelltod ermitteln, jedoch deutet die erhöhte relative Aktivität der Caspase-8 & -9 bei Ko-Transfektion des TCA im Vergleich zur Einzeltransfektion unabhängig von der Wirkstoffzugabe auf eine gesteigerte Apoptoserate hin.

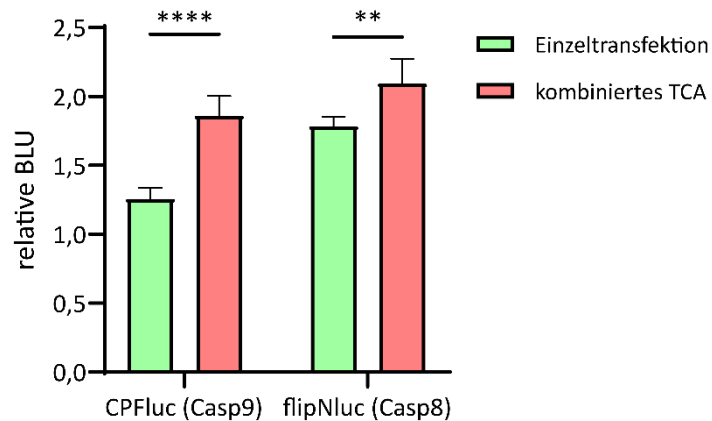


Abbildung 28: Apoptose transfizierter Zellen ohne Wirkstoffzugabe. Darstellung der relativen Signaländerung von t = 1 h auf t = 8,5 h für die Kontrollbedingung „keine Wirkstoffzugabe“ bei der Einzeltransfektion von Reportern sowie innerhalb des ko-transfizierten *Triple Caspase Assays*. Relative Werte ergeben sich durch Division der Messungen bei t = 8,5 h durch die Werte bei t = 1 h. Fehlerbalken repräsentieren die SD (** = p < 0,01; **** = p < 0,0001).

Damit die parallele Messung beider Luciferasen ohne komplexe Nachberechnungen möglich ist, dürfen verwendete Emissionsfilter nur das Signal eines der Reporter erfassen. Zur Validierung wird das Signal einer permanent aktiven Nluc und Fluc mithilfe der Emissionsfilter F460 bzw. 560/10 gemessen. Hieraus wird für die Reporter die Transmission $\kappa = \frac{\text{FLU(Filter)}}{\text{FLU(kein Filter)}}$ für beide Filter ermittelt, um potenzielle Überlappungen der detektierten Spektren zu identifizieren. Die Transmission des emittierten Spektrums der Nluc durch den Filter 560/10 liegt bei 0,27 %, die der Fluc durch den Filter 460/10 bei 0,19 % (vgl. **Tabelle 16**). Somit ist lediglich ein geringer, vermutlich vernachlässigbarer Effekt auf die Messung des jeweils anderen Reporters zu erwarten.

Tabelle 16: Transmission der Emissionsspektren von Nluc bzw. Fluc.

	Nluc	Fluc
$\kappa_{460/10}$	0,1954	0,0019
$\kappa_{560/10}$	0,0027	0,1406

3.4.3 Stabiler Knock-In des Triple Caspase Assays in HCT116

Um den zellulären Stress durch Lipofektion zu reduzieren und gleichzeitig die Durchführung von Messungen zu vereinfachen, wird die stabile Zelllinie HCT116 TCA etabliert. Hierfür erfolgt mittels lentiviraler Transduktion die Integration der kombinierten Konstrukte flip-mNG3A (Casp3), flipNluc (Casp8) sowie CPFluc (Casp9) in das Genom der Zellen. Die integrierte Gensequenz mit einer Länge von ca. 4 kb wird zunächst zur Erfolgskontrolle mittels PCR nachgewiesen. Hierfür wird die DNA aus den transduzierten und selektionierten Zellen extrahiert. Die Klone TCA9 sowie TCA11 zeigen das entsprechende amplifizierte Segment (vgl. **Abbildung 29 A**). Außerdem erfolgt nach der Sequenzierung ein Western-Blot zur Prüfung der Proteinexpression. Detektiert werden die integrierten Tags: VSV-G-Tag an flip-mNG3A (Casp3), OLLAS-Tag an flipNluc (Casp8) sowie cMyc-Tag an CPFluc (Casp9). Für die Klone TCA9 und TCA11 erfolgt der Expressionsnachweis für flip-mNG3A (Casp3) sowie für flipNluc (Casp8). Der cMyc-Tag an CPFluc (Casp9) mit einer Größe von ≈ 62 kDa kann aufgrund einer Überlagerung mit dem physiologisch in Zellen vorkommenden Myc Protein (≈ 62 kDa) nicht eindeutig detektiert werden (vgl. **Abbildung 29 B**).

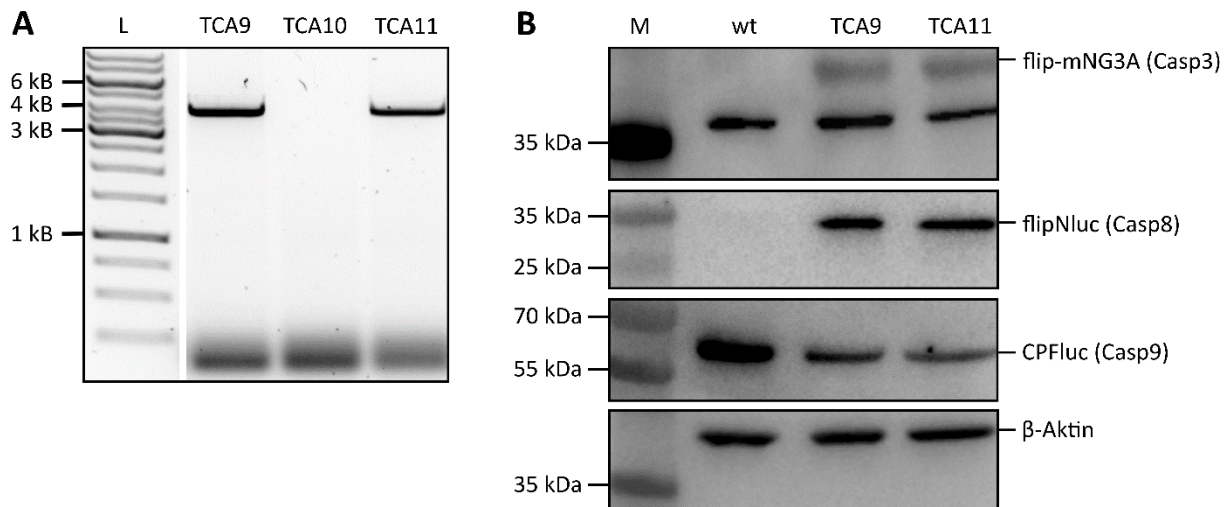


Abbildung 29: Validierung der stabilen Zelllinie HCT116 TCA. (A) PCR zur Amplifikation des integrierten Reporterpanels im Rahmen der Genotypisierung transduzierter Zellen (L = DNA-Leiter; TCA = *Triple Caspase Assay*; die Zahl hinter TCA gibt jeweils die Nummer des Klons an). (B) Western-Blot zur Kontrolle der Genexpression. Zelllysate werden aus den kultivierten Zellen während des Splittens gewonnen (M = Protein-Marker; WT = HCT116 WT; TCA = *Triple Caspase Assay*).

4 Diskussion

Das KKR stellt heutzutage in Industrienationen die zweithäufigste krebbsbedingte Todesursache dar [9]. *Morgan et al.* prognostizieren für das Jahr 2040 eine weltweite Inzidenz von 3,2 Millionen und eine Mortalität von 1,6 Millionen Fällen [3]. Im Vergleich zu aktuellen Daten ist demnach mit einem deutlichen Anstieg zu rechnen [118]. Dies bedeutet nicht zuletzt auch eine ökonomische Belastung für die Gesellschaft durch direkte Krankheitskosten und den resultierenden Produktivitätsverlust [119]. So werden die Gesamtkosten des KKR in Europa für das Jahr 2018 auf 19 Mrd. Euro geschätzt [119,120]. Etablierte Früherkennungsprogramme zum *Screening* der asymptomatischen Bevölkerung führen zu einer signifikanten Mortalitätsreduktion, sind dabei kosteneffizient und reduzieren somit die KKR-assoziierte wirtschaftliche Belastung [50,52,121]. Zwar empfiehlt die S3-Leitlinie *Kolorektales Karzinom* die Koloskopie als Standardmethode zum *Screening* der asymptomatischen Bevölkerung, diese Untersuchung geht jedoch laut *Wu et al.* mit einer Adhärenz von lediglich 76,6 % einher, was ihre Effektivität verringert [37,50,122]. Der Einsatz nicht-invasiver Tests wird hingegen laut einer deutschen Studie von *Adler et al.* von Patienten bevorzugt. 97 % der Patienten haben hierbei einer nicht-invasiven Untersuchung nach vorheriger Ablehnung einer Koloskopie zugestimmt [53]. Für die flächendeckende Etablierung solcher Methoden zum primären *Screening* fordert die CMS (*Centers for Medicare & Medicaid Services*) eine Sensitivität von $\geq 74\%$ und eine Spezifität $\geq 90\%$, was derzeit durch keinen zugelassenen blutbasierten Test erreicht wird [123]. Daher werden neue Biomarker und innovative diagnostische Tools benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein neuartiger Ansatz zur Detektion malignen Gewebes anhand spezifischer Methylierungsalterationen vorgestellt. Differenzielle Methylierung zeigt sich bereits im Rahmen etlicher Studien als vielversprechender Biomarker [55,124].

Zusätzlich könnte ein System, welches maligne Zellen des KKR zuverlässig anhand charakteristischer Muster identifiziert, unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduzieren, indem Therapeutika erst gezielt innerhalb dieser Zellen freigesetzt oder aktiviert werden. Insbesondere klassische Chemotherapeutika wie Platinderivate gehen mit unerwünschter systemischer Toxizität einher, die teilweise das Absetzen der Wirkstoffe erforderlich macht und die Lebensqualität der Patienten langfristig beeinträchtigt [61,62].

4.1 Methylierungsmuster maligner Zellen und Identifikation neuer hypermethylierter Biomarker-Kandidaten

Neben der Hypermethylierung spezifischer CpG-Inseln zeigen sich klassischerweise beim KRK auch hypomethylierte DNA-Abschnitte [64,125]. In dieser Arbeit werden zunächst Methylierungsniveaus von 10 kb langen Genomfragmenten zwischen malignem und gesundem Gewebe verglichen (vgl. Kapitel 3.1.2). Bei globaler Betrachtung fallen neben einer Häufung hypermethylierter Regionen auch zahlreiche 10 kb Elemente mit geringerer Methylierung in malignen Zellen auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von *Feinberg & Vogelstein* beschriebenen genomweiten Hypomethylierung [64]. Sie tritt bevorzugt in definierten Regionen wie beispielsweise in repetitiven DNA-Sequenzen auf, weshalb sie durch die gewählte Betrachtung starr definierter 10 kb Fragmente nicht vollends dargestellt wird [126]. Die verstärkte Methylierung untersuchter Genabschnitte kommt in KRK-Proben durch enthaltene hypermethylierte CpG-Inseln zustande, die vor allem im Promotor charakteristischer Gene liegen [32,72].

Für den hier untersuchten Datensatz zeigt die Methylierung der CpG-Inseln eine bimodale Verteilung (vgl. Kapitel 3.1.2): Sie sind entweder nahezu komplett unmethyliert oder fast vollständig methyliert. Diese Verteilung, bei der in gesundem Gewebe ungefähr 30 % der CpG-Inseln methyliert vorliegen, entspricht bisherigen Erkenntnissen [127,128]. Zahlreiche CpG-Inseln sind jedoch in malignem Gewebe hypermethyliert und können somit durch ihre regulatorische Funktion im Promotor zu einer verminderten Genexpression (u.a. von Tumorsuppressorgenen) führen [73,129,130]. Dadurch tragen sie zur Karzinogenese und Tumorphiliferation des KRK bei [49,73].

Wir identifizieren hypermethylierte Biomarker mithilfe des WGS. Während bisherige Studien DMR meist durch Sequenzierung von Methylierungsarrays ermitteln und somit nur eine kleine Anzahl der vorhandenen CpG-Loci erfassen, stellt unsere Methode eine *unbiased* Möglichkeit zur Identifikation weiterer DMR dar, die bisher nicht detektiert werden [131]. Durch die insgesamt geringere Genom-Coverage unserer Sequenzierungen, sollten sie als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. So kann beispielsweise die Validierung entdeckter DMR anhand bestehender WGS-Datensätze oder durch gezielte methylierungsspezifische PCR erfolgen [131,132]. Diese Arbeit bietet einen wertvollen Beitrag zur Erforschung neuer Biomarker. Die Berechnung der differentiellen Methylierung erfolgt mittels *DSS*, einem

Algorithmus der auch zur Analyse bei entsprechend geringer *Coverage* geeignet ist [111,112,133].

Tabelle 17: *In silico* identifizierte hypermethylierte Biomarker und bereits publizierte Arbeiten. Ein Gen wird als erstbeschrieben klassifiziert, sofern es durch keine Publikation als im KRK hypermethyliert beschrieben wird (Stand: Juli 2025).

Gen	Beschrieben von	Referenz
ALX3	<i>Mori et al., 2011</i>	[134]
EN1 & SCTR	<i>Frigola et al., 2006</i>	[135,136]
EN2, MSX1 & PDX1	<i>Lee et al., 2022</i>	[137]
GAD2	<i>Li et al., 2011</i>	[138]
GATA5	<i>Hellebrekers et al., 2009</i>	[139]
IKZF1	<i>Javierre et al., 2011</i>	[140,141]
IRF4	<i>Øster et al., 2011</i>	[142]
LONRF2	<i>Hua et al., 2017</i>	[143]
NKX1-1	<i>Molnár et al., 2018</i>	[144]
SALL3	<i>Zhang et al., 2015</i>	[145]
SDC2	<i>Oh et al., 2013</i>	[146]
SOX1	<i>Huang et al., 2017</i>	[147]
TFPI2	<i>Glöckner et al., 2009</i>	[148]
TP73	<i>Molnár et al., 2018</i>	[144]
VWC2	<i>Cheng et al., 2022</i>	[149]
DLX4	Erstbeschreibung für das KRK	
FOXC2	Erstbeschreibung für das KRK	
MNX1	Erstbeschreibung für das KRK	
PCDH7	Erstbeschreibung für das KRK	
PCDH8	Erstbeschreibung für das KRK	
RASAL3	Erstbeschreibung für das KRK	
SIX1	Erstbeschreibung für das KRK	

Neben den hypermethylierten Genen *SCTR* und *EN1*, welche 2006 durch *Frigola et al.* beschrieben und in einer vorherigen Arbeit zur Entwicklung des Reportersystems eingesetzt werden, können weitere hypermethylierte Biomarker-Kandidaten identifiziert werden [80,135,136]. Etliche dieser DMR überlappen sich mit Erkenntnissen bereits publizierter Arbeiten. So weist *IKZF1* im KRK eine hohe Methylierung auf, wodurch maligne Zellen die Fähigkeit der Zellregulierung und Differenzierung verlieren [140,141]. Die Rolle von *VWC2* wird von *Cheng et al.* dargestellt: Die Hypermethylierung führt durch *Gene Silencing* zu einer geringeren *VWC2*-Expression und damit einhergehend zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Die erneute Expression des Proteins hemmt hingegen das Zellwachstum [149]. Unsere Analyse bestätigt zudem weitere Biomarker, die erst innerhalb einzelner Studien publiziert wurden. So stellen beispielsweise *SDC2* und *TFPI2* hochsignifikante Hits dar. Sie sind bereits als Methylierungsmarker etabliert und weisen im

Rahmen von Studien mittels Stuhltest eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion des KRK auf – insbesondere bei kombinierter Verwendung [146,148,150]. Eine Auflistung der weiterführend untersuchten Methylierungsmarker mit jeweiligen Referenzen ihrer Erstbeschreibung, sofern vorhanden, findet sich in **Tabelle 17**.

In vorliegender Arbeit wird *MNX1* unseres Wissens erstmalig (Stand: Juli 2025) als beim KRK hypermethyliert beschrieben. *Li et al.* zeigen in untersuchten KRK-Proben eine höhere Expression für das Homöobox-Gen *MNX1* und eine Korrelation mit einer längeren durchschnittlichen Überlebenszeit [151]. In weiteren Untersuchungen könnte daher die Frage geklärt werden, inwieweit *MNX1*-Hypermethylierung zu *Gene Silencing* führt, mit schlechterem Outcome assoziiert und somit als prognostischer Biomarker geeignet ist. Auch für *FOXC2* ist bisher keine Hypermethylierung beim KRK bekannt. Erhöhte Methylierungsniveaus von *PCDH7* und *PCDH8*, die für Regulatoren von Zell-Zell-Kontakten kodieren, sind bisher lediglich für das Blasenkarzinom beschrieben, wobei *PCDH8* zusätzlich im klarzelligen Nierenzellkarzinom sowie im hepatozellulären Karzinom als hypermethylierter Marker fungieren kann [152–155]. Eine Hypermethylierung des Homöobox-Gens *DLX4* dient zwar bereits als prognostischer Marker im Kontext hämatologischer Erkrankungen, wird hiermit jedoch erstmalig im KRK identifiziert [156,157]. Beim KRK wird *SIX1* häufig verstärkt exprimiert, was zu Tumorpheriferation und verstärkter Metastasierung führt. In vorliegender Untersuchung weist der Promotor jedoch eine Hypermethylierung auf, die durch *Gene Silencing* eher einen gegenteiligen Effekt vermuten lässt. Daher könnte für unser Probenkollektiv eine Expressionskontrolle beispielsweise mittels Western-Blot erfolgen und der Methylierungsstatus von *SIX1* als protektiver Biomarker evaluiert werden [158].

Interessanterweise weist auch die Probe F7, die aus endoskopisch unauffälligem Gewebe eines Patienten mit Rektumkarzinom stammt, in den DMR der Gene *EN1*, *GAD2*, *IKZF1* & *NKX1-1* eine statistisch signifikante Hypermethylierung auf (vgl. **Abbildung 14 I**). Dies könnte ein Hinweis auf epigenetische Veränderungen der vermeintlich gesunden Tumorumgebung sein. Ähnliche Effekte sind bereits für somatische Mutationen bekannt [159].

Die in Kapitel 3.1.6 aufgeführte *Gene Ontology* Analyse zeigt, dass innerhalb der hypermethylierten Gene bestimmte biologische Prozesse überrepräsentiert sind. Hierzu gehören neben regulatorischen Prozessen auch Entwicklungsprozesse sowie der Wnt-Signalweg. Der aktivierte Wnt-Signalweg reguliert die Expression abhängiger Gene und ist neben der frühen Embryogenese auch im Rahmen der Tumorentwicklung von Bedeutung –

unter anderem durch Inhibition der Apoptose [160,161]. Während der Karzinogenese des KRK wird durch die Hypermethylierung von Genen extrazellulärer Wnt-Inhibitoren (z. B. Gene der *SFRP*-Familie & *WIF-1*) der Wnt-Signalweg verstärkt aktiviert [160,162–164]. Dies führt zu einer erhöhten Zellproliferation und somit zur Tumorprogredienz [162,165].

Auch Gene des Cadherin-Signalwegs sind unter den hypermethylierten Genen überrepräsentiert. Der Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin führt über verschiedene Mechanismen zur Invasion maligner Zellen und zur Tumorprogression [166,167]. In der Literatur wird die verringerte Expression von E-Cadherin primär auf *Gene Silencing* durch Hypermethylierung und nicht auf somatische Genmutationen zurückgeführt [168,169]. Auch die in dieser Arbeit durchgeführte *Gene Ontology* Analyse deutet auf diese Art der Inaktivierung hin.

Durch unsere Arbeit wurden *DLX4*, *FOXC2*, *MNX1*, *PCDH7*, *PCDH8*, *RASAL3* sowie *SIX1* als potenzielle neue hypermethylierte Biomarker-Kandidaten für das KRK beschrieben. Neben der Eignung für das entwickelte Methylierungsreportersystem können diese Gene hinsichtlich ihrer Detektionsfähigkeit für das KRK und seiner Vorstufen mittels Stuhltest evaluiert werden. Die Bedeutung solcher Methylierungsmarker für hochsensitive diagnostische Methoden zur Erkennung von (Prä-)kanzerosen wurde zuletzt 2024 durch *Imperiale et al.* bestätigt [56].

4.2 Etablierung eines Systems zur Detektion hypermethylierter CpG-Inseln

Zunächst erfolgt die Anpassung des in Vorarbeiten beschriebenen Systems zur Detektion maligner Zellen anhand hypermethylierter CpG-Inseln, sodass die zuvor identifizierten Biomarker-Kandidaten (vgl. Kapitel 4.1) in Genpanels untersucht werden können. Für diese Biomarker zeigt die Messung der induzierten flipNluc ein erhöhtes Signal. Die Promotorregionen der als Kontrolle eingesetzten Housekeeping-Gene *B2M*, *PPIA* & *UBC* liegen im KRK typischerweise unmethyliert vor und dienen in Studien verbreitet als Expressionskontrollen [170,171]. Entgegen der ursprünglichen Annahme wird durch das Reportersystem auch ein Signal für die Ko-Transfektion von *empty guide* mit dem dCas9-Konstrukt sowie für die Einzeltransfektion der MBD-Konstrukte detektiert. Hierbei ist zu beachten, dass das Plasmid des MBD-Konstrukts auch die flipNluc kodiert (vgl. Kapitel 1.3). Bereits während der Etablierung der flipNluc zeigte sich im inaktiven, nicht induzierten Zustand eine diskrete Hintergrundlumineszenz [80]. Zusätzlich kann eine quantitativ unterschiedliche Genexpression für das teils höhere Signal bei Einzeltransfektion des MBD-

Konstrukts (und damit der flipNluc) mitverantwortlich sein. Da Zellen laut *Frei et al.* nur begrenzte Ressourcen für die Transkription und Translation transfizierter Plasmide haben, liegt bei der Einzeltransfektion vermutlich mehr flipNluc vor [172,173]. Dies führt potenziell zu einem stärkeren Hintergrundsignal des inaktiven Reporterproteins. Weiterhin wird mit dem Plasmid (ca. 10,2 kb), welches für das dCas9-Konstrukt kodiert, ein verglichen mit dem des MBD-Konstrukts (ca. 8,8 kb) längerer Vektor eingesetzt. Wie durch *Boye et al.* beschrieben, sinkt die Genexpression mit der Größe der Plasmide [174]. Außerdem kann durch Transfektion zellulärer Stress entstehen, der durch Toxizität zu einer verminderten Zellzahl und damit zu einem geringeren flipNluc-Signal führt [175]. Auch die simultane Verwendung des CAG-Promotors für beide Plasmide könnte durch Wechselwirkungen zu einer geringeren Expression der flipNluc führen. Für die Ko-Transfektion verschiedener Promotoren ist ein solcher Effekt durch *Huliák et al.* nachgewiesen [172,176]. Zuletzt kann die Expressionseffizienz auch dann variieren, wenn sich die Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden [177]. Diese Erklärungsansätze scheinen jedoch die bei Einzeltransfektion des MBD-Konstrukts messbaren Signale nur zum Teil zu erklären, da für die unmethylierten Kontrollen replizierbar eine signifikant geringere Lumineszenz detektiert wird.

Daher wird zusätzlich untersucht, ob die Einzelkonstrukte des Reportersystems die flipNluc induzieren können (vgl. Kapitel 3.2.2). Hierbei zeigt sich, dass das MBD-Konstrukt weder allein noch in Kombination mit dem dCas9-Konstrukt zu einer signifikanten Aktivierung der flipNluc durch Spaltung der TEV-Erkennungssequenz ENLYFQS führt (vgl. **Abbildung 17**) [178]. Zudem werden die splitTEVp-Fragmente isoliert auf eine mögliche katalytische Restaktivität überprüft. Obwohl die katalytische Triade (aktives Zentrum) der splitTEV-Protease auf beide Fragmente geteilt wird (His46 auf TEVp3-70aa; Asp81 & Cys151 auf TEVp61-242aa), kann in dieser Arbeit eine statistisch signifikante Induktion der flipNluc durch TEVp61-242aa demonstriert werden (vgl. **Abbildung 19**) [87]. Diese Beobachtung ist überraschend, da für eine effiziente Proteasenfunktion alle Bestandteile im aktiven Zentrum des Enzyms vorhanden sein müssen. Mit dem Histidin fehlt entsprechend die Base, die ein Proton des Cysteins aufnimmt und damit zur Bildung eines nukleophilen Rests führt [179]. Zwar besitzt das Einzelfragment eine geringe Restaktivität, die rekonstituierte TEV-Protease sollte jedoch eine deutlich gesteigerte Aktivität (laut *Wehr et al.* ca. 35 % von TEVp1-242aa) aufweisen und damit zu einer eindeutigen Induktion von flipNluc führen [80,87]. Dieser erwartete

Signalanstieg kann allerdings auch bei Ko-Transfektion beider splitTEVp-Intein-Konstrukte nicht gezeigt werden (vgl. **Abbildung 19**).

Daher wird untersucht, inwieweit das Intein-Splicing im vorliegenden System mit kovalenter Bindung der splitTEVp-Fragmente an den C- bzw. N-Terminus des split-Inteins erfolgreich ist. Dies könnte beispielsweise durch sterische Hemmung der Inteine durch die angehängten TEV-Bestandteile unterbleiben. Somit könnte weder eine rekonstituierte splitTEV-Protease entstehen noch Lumineszenz induziert werden. Die Abhängigkeit der Splicing-Effizienz von den Exteinen wird für gp41-1 durch *Beyer et al.* beschrieben [180]. Aufgrund der gemessenen Fluoreszenz nach Rekonstitution eines gespaltenen mNG im Rahmen des Intein-Splicing, kann diese These jedoch verworfen werden.

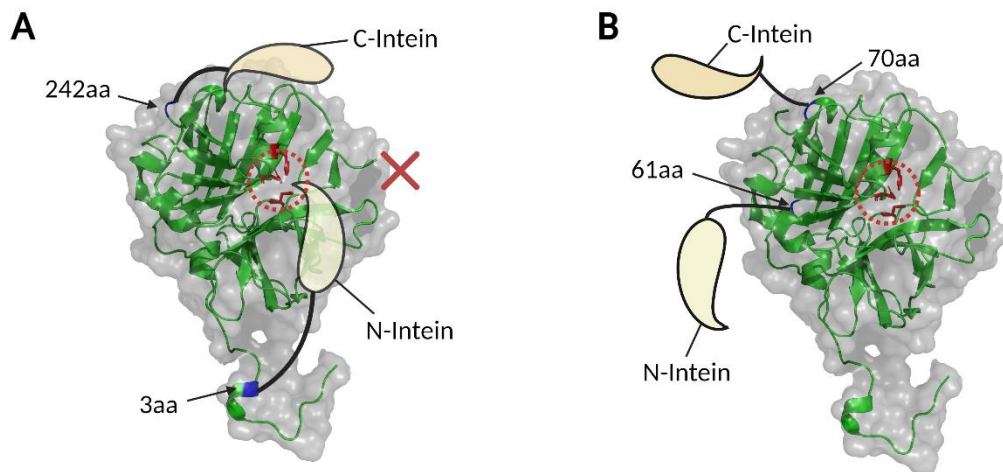


Abbildung 30: 3D-Struktur der TEV-Protease und sterische Hemmung durch Intein. (A) Variante 1 sowie **(B)** Variante 2 der splitTEVp-Intein-Konstrukte. Das aktive Zentrum bzw. die katalytische Triade ist rot markiert, die Aminosäuren, an die die Inteine binden, sind blau markiert und mit Pfeilen bezeichnet.

Nachdem das Intein-Splicing im vorliegenden System offenbar effizient erfolgt, wird mithilfe der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Modifikation des splitTEVp-Intein-Konstrukts eine deutliche Induktion der flipNluc erzielt. Diese Optimierung könnte durch sterische Effekte zu erklären sein: Der zusammengesetzte Komplex aus splitTEVp und Intein verhindert durch das N-Intein an Position 3aa in der ursprünglichen Konfiguration, dass die ca. 32 kDa große flipNluc das aktive Zentrum der Protease erreicht. Sie wird demnach nicht in ihre aktive Form überführt. Durch die Verlagerung der Bindestelle des restlichen Konstrukts, schematisch dargestellt in **Abbildung 20 C-D**, wird der Zugang zur katalytischen Triade wieder ermöglicht (vgl. **Abbildung 30**). Eine verschlechterte *Cleavage* durch sterische Hemmung bei kovalenter Bindung von weiteren Proteinen an die TEV-Protease wird in der Literatur bereits mehrfach aufgeführt [181,182].

Die vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich einer effizienteren flipNluc-Induktion mithilfe der optimierten Variante des splitTEVp-Intein-Konstrukts konnten auch bei Implementierung in das MBD-Konstrukt des Methylierungsreportersystems bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.2.5). Die Modifikation des MBD-Konstrukts ist in **Abbildung 31** dargestellt. Die ursprünglich unbefriedigende Induktion der flipNluc liegt auf Basis der durchgeführten Untersuchungen demnach am ehesten an der sterischen Hemmung der TEV-Protease durch das split-Intein an TEVp3aa. Nach Änderung der Bindungsstelle auf TEVp70aa wird die effektive Proteasenfunktion wiederhergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wird durch eine deutlich verbesserte Induktion der flipNluc aufgrund der rekonstituierten splitTEV-Protease die Signalspezifität des Reportersystems gesteigert. Das Hintergrundrauschen der inaktiven Luciferase wird dadurch relativ betrachtet um ein Vielfaches kleiner, was den Einfluss auf Messungen reduziert. Eine deutliche Diskriminierung zwischen Einzeltransfektion des MBD- bzw. des dCas9-Konstrukts und deren Kombination ist nun möglich. Zudem ist das kombinierte System in der Lage, hypermethylierte CpG-Inseln von unmethylierten Kontrollen statistisch signifikant zu differenzieren. Allerdings ist hierbei der relative Signalunterschied geringer als bei der ursprünglichen Variante. Die Länge der Linker innerhalb des Konstrukts ist von zentraler Bedeutung für deren Flexibilität und könnte auch unspezifische Interaktionen zwischen N- und C-Intein bzw. N- und C-TEVp ermöglichen, sofern sie zu groß ist [84,183]. Daher könnte eine zukünftige Anpassung dieser Linker zu einer Reduktion der unspezifischen Freisetzung der splitTEV-Protease führen, was den Signalunterschied zwischen hypo- und hypermethylierten CpG-Inseln steigert.

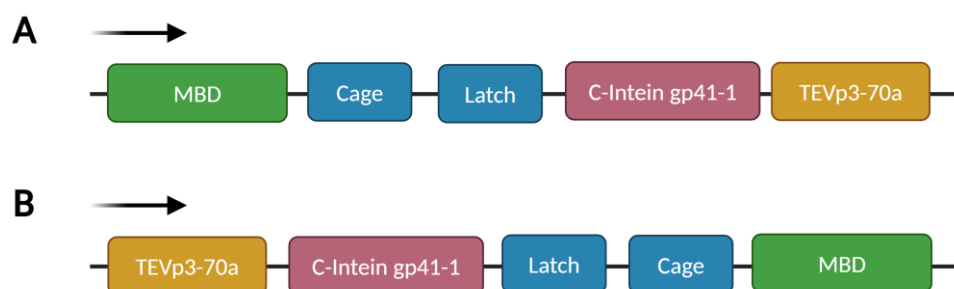


Abbildung 31: Modifikation des MBD-Konstrukts. Vereinfachter Ausschnitt der Plasmidkarten des (A) ursprünglichen sowie (B) optimierten MBD-Konstrukts des Methylierungsreportersystems. Der Pfeil gibt die Syntheserichtung an. Diese Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.

Insgesamt wird in dieser Arbeit die Entwicklung eines Reportersystems zur Detektion malignen Gewebes anhand spezifischer Hypermethylierung von CpG-Inseln weiter vorangetrieben.

4.3 Hängt die Affinität der dCas9 vom Methylierungsgrad der genomischen Zielstruktur ab?

Durch die in Kapitel 3.3 beschriebene ChIP wird untersucht, inwieweit das dCas9-Konstrukt bevorzugt in unmethylierten Zielregionen bindet. Trifft diese Hypothese zu, führt dies zu einer verringerten Effizienz des Methylierungsreportersystems. Trotz vorhandenem MBD-Konstrukt in hypermethylierten Regionen bindet dann unter Umständen kein dCas9-Konstrukt, wodurch keine splitTEV-Protease freigesetzt werden kann und das detektierbare Signal geringer ausfällt. Hinsichtlich der spezifischen dCas9-DNA-Interaktion wird tatsächlich eine statistisch signifikante Präferenz für unmethylierte Genloci nachgewiesen. Dies steht im Kontrast zu bisherigen Studien. So zeigen *Hsu et al.*, dass die Nukleaseaktivität der SpCas9 auch für methylierte DNA gegeben ist [184]. Demnach wäre von keiner Beeinflussung der dCas9-DNA-Interaktion auszugehen, bei der es sich lediglich um eine katalytisch inaktive Form der SpCas9 handelt [81]. Die Validität unserer Ergebnisse ist jedoch im Kontext der hohen Standardabweichung und der weiteren Versuchsbedingungen zu sehen, die folgend diskutiert werden.

Da die Aussagekraft einer ChIP maßgeblich von der Spezifität des verwendeten Antikörpers abhängt, besteht durch die Wahl des Cas9-AK eine mögliche Störanfälligkeit [185]. Laut Datenblatt des Herstellers Active Motif ist der verwendete Cas9-Antikörper für eine ChIP validiert und „sollte“ auch die dCas9 erkennen [186]. Inwieweit er jedoch die dCas9 auch im Kontext des verwendeten Gesamtkonstrukts detektieren kann, wird in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Eine entsprechende Validierung des Antikörpers kann beispielsweise mittels Western-Blot erfolgen. Zudem könnte eine unspezifische Antikörper-Bindung das detektierte Signal ohne Transfektion des dCas9-Konstrukts erklären. Des Weiteren ist das Auflösungsvermögen der hier durchgeführten ChIP suboptimal, da die eingesetzten Chromatinfragmente mit einer Länge von teilweise > 4 kb größer als vom Hersteller empfohlen (< 1 kb) sind (vgl. Kapitel 2.5) [185,187]. Bei einer erneuten Durchführung des Versuchs sollte dies durch veränderte experimentelle Bedingungen verbessert werden.

Frühere Untersuchungen zeigen, dass die SpCas9 auch ohne Vorhandensein einer sgRNA an die PAM-Sequenz innerhalb der DNA binden kann [188,189]. Diese unspezifische Interaktion erklärt gemessene Signale trotz Solotransfektion des dCas9-Konstrukts, welches vermutlich zufällig in den analysierten Regionen eine Bindung eingeht. Zu beachten ist hierbei, dass durch

diesen Effekt auch im Methylierungsreportersystem ein unspezifisches Signal induziert werden könnte, sofern das dCas9-Konstrukt ungezielt an einer Stelle in räumlicher Nähe zum MBD-Konstrukt bindet und dadurch die splitTEV-Protease freigesetzt wird.

4.4 Einblicke in Apoptose-Signalwege durch real-time Caspasen-Detektion

Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle für die Zellregulation während der Entwicklung und dient der Aufrechterhaltung physiologischer Zellhomöostase [92]. Auch im Rahmen immunologischer Prozesse sowie bei Zellschädigung durch Einwirkung toxischer Substanzen dient sie als Abwehrmechanismus [92,190]. Eine fehlerhafte Regulation ist an der Pathogenese diverser Krankheiten beteiligt und kann im Rahmen der Karzinogenese auch zu Malignomen führen [92,191]. Die Apoptose wird durch die Aktivierung von Caspasen induziert [93,192]. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt: Zu den Initiatoren gehören Caspase-8 & -9, zu den Effektoren Caspase-3 & -7 [92,94]. Eine Unterscheidung zwischen extrinsischer und intrinsischer Apoptose kann anhand der Differenzierung der Caspasen-8 und -9 vorgenommen werden [93,94]. Durch sie wird letztlich die Effektor-Caspase-3 aktiviert, mit der bisher ein „*point of no return*“ definiert wurde [93,193,194].

Eine Messung der Caspasen-Aktivität in Echtzeit und in lebenden Zellen ermöglicht Einblicke in zelluläre Abläufe der Apoptose, die nicht zuletzt für die Entwicklung neuer Therapeutika vonnöten sind [195]. Bisherige Assays zur parallelen Caspasen-Detektion basieren meist auf Fluoreszenzreportern, wobei für die Messung einzelner Caspasen bereits Luciferasen eingesetzt werden [195,196]. In dieser Arbeit wird ein Ansatz zur gleichzeitigen Bestimmung dreier Caspasen (3, 8 & 9) mithilfe von zwei induzierbaren Luciferasen sowie flip-mNG3A vorgestellt.

Mittels Apoptose-Induktion durch verschiedene gut charakterisierte Wirkstoffe wird nachgewiesen, dass die klonierten Reportersysteme tatsächlich durch Caspasen induziert werden können (vgl. Kapitel 3.4.1). So zeigt die flipNluc (Casp8) einen Signalanstieg nach Zugabe des CD95/Fas-Liganden, der über Caspase-8 zur Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs führt [197].

Auch die getesteten Reportersysteme zur Detektion der Caspase-3 verdeutlichen ihre Funktionsfähigkeit durch einen signifikanten Signalanstieg nach Induktion mittels Staurosporin, das durch die Aktivierung der Caspase-3 zum Zelltod führt [198]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Caspase-3 durch die eingesetzten Reporter nicht von Caspase-7

unterschieden werden kann, da beide Proteasen die gleiche Erkennungssequenz aufweisen [95]. Eine verstärkte Aktivität der Caspase-9 im Rahmen der intrinsischen Apoptose wird durch die bereits etablierte Luciferase CPFluc (Casp9) nach Zugabe von ABT-199 sowie Panobinostat gemessen [100]. Beide Wirkstoffe setzen durch Aktivierung der Caspase-9 die intrinsische Apoptose in Gang, wobei insbesondere für den HDAC-Inhibitor Panobinostat auch eine Mitbeteiligung der Caspase-8 bekannt ist [199,200].

Im Rahmen eines *Proof of Concept* werden Reporterproteine für die parallele Detektion der Caspasen-3, -8 und -9 ko-transfiziert, um die aktivierten Signalwege der oben genannten Apoptose-Induktoren zu untersuchen. Der diskrete Anstieg der CPFluc (Casp9) nach Induktion mittels CD95/Fas-Liganden deutet auf eine Beteiligung des intrinsischen Apoptosewegs hin. Dieses Signal kommt vermutlich durch die Spaltung des Bid-Proteins durch Caspase-8 zu tBid und der daraus resultierenden Aktivierung von Caspase-9 zustande, die wiederum durch das Reporterprotein detektiert wird (vgl. **Abbildung 4**) [93,96,99,201]. Diese Verzahnung zwischen CD95/Fas-Liganden initiiert Apoptose und der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien wird bereits 1998 durch *Luo et al.* sowie *Li et al.* beschrieben [96–98]. Der verzögerte Anstieg der Effektor-Caspase-3 lässt sich anhand ihrer nachgelagerten Aktivierung durch die Caspasen-8 & -9 erklären [92,93]. Bei Zugabe von Staurosporin zeigt sich initial vor allem ein Anstieg des relativen Fluoreszenzsignals für flip-mNG3A (Casp3), was durch die zentrale Rolle der Caspase-3 bei Staurosporin-vermitteltem Zelltod zustande kommt [198,202].

Eine Interferenz beider Luciferasen wird durch deren Substratspezifität ausgeschlossen, da je nach zugegebenem Substrat nur die flipNluc oder die CPFluc Lumineszenz emittiert [90]. Die Messergebnisse aus dem *Proof of Concept* des entwickelten TCA deuten darauf hin, dass auch die parallele Messung der Luciferasen nach Zugabe beider Substrate ohne Beeinflussung möglich ist. Voraussetzung für die Differenzierung beider Reporter während der Messung sind Emissionspektren, die sich möglichst wenig überlagern und damit durch entsprechende Filter voneinander getrennt detektiert werden können [90,203]. Dies ist aufgrund der großen Differenz zwischen der maximalen Emission bei $\lambda_{em_max}(Nluc) = 462\text{ nm}$ und $\lambda_{em_max}(Fluc) = 562\text{ nm}$ gegeben [90]. Auch in vorliegender Arbeit ist der *Overlap* bei den verwendeten Emissionsfiltern minimal und stellt somit keine Limitation dar (vgl. Kapitel 3.4.2). Für andere experimentelle Bedingungen oder andere verwendete Filter muss die Transmissionsbestimmung jedoch wiederholt werden, da das emittierte Spektrum der

Luciferasen von äußeren Faktoren wie dem pH-Wert und der Temperatur abhängig ist [90,204]. Die Fluoreszenz muss bei dem hier vorgestellten *Triple Caspase Assay* in einem separaten Well ohne Substrat gemessen werden, da D-Luciferin selbst Fluoreszenz in einem Spektrum aufweist, das die unabhängige Messung von flip-mNG3A nicht erlaubt [205,206].

Der relative Signalanstieg der CPFluc (Casp9) fällt für die Induktion mittels ABT-199 und Panobinostat bei ko-transfiziertem TCA verglichen mit der Einzeltransfektion deutlich geringer aus. Zellulärer Stress, der durch Ko-Transfektion mehrerer Plasmide und durch die Methode der Lipofektion auftritt, könnte auch innerhalb der Kontrollbedingung ohne Wirkstoffzugabe zur Aktivierung von Caspasen führen [175,207]. Da Messungen auf diese Kontrolle relativiert werden, wäre ein geringerer relativer Anstieg der CPFluc-Induktion die Folge. Diese Annahme wird bekräftigt, da eine verstärkte Induktion der CPFluc (Casp9) & flipNluc (Casp8) ohne Zugabe von Therapeutika für die Ko-Transfektion vorliegt (vgl. **Abbildung 28**). Außerdem wird durch *Sarrion-Perdigones et al.* eine verstärkte Variabilität der Genexpression bei Ko-Transfektion im Vergleich zur Transfektion einzelner Plasmide demonstriert, was die Relativierung ebenfalls störanfälliger macht [90]. Eine Integration des TCA in Form einer stabilen Zelllinie führt zur Reduktion genannter Einflüsse [90]. Zudem werden künftige Experimente sowie die weitere Validierung des Systems vereinfacht, da keine vorherige Transfektion mehr erforderlich ist.

Mithilfe lentiviraler Transduktion wird im Rahmen dieser Arbeit die stabile Zelllinie HCT116 TCA etabliert. Nach Überprüfung der integrierten Sequenz wird mittels Western-Blot die Expression der Reporter flipNluc (Casp8) und flip-mNG3A (Casp3) nachgewiesen. Die Bande der CPFluc (Casp9) bzw. des daran angehängten cMyc-Tags lässt sich allerdings nicht klar abgrenzen, da sich das Molekulargewicht mit dem physiologisch in Zellen vorkommenden Myc-Protein überschneidet. Sowohl der Reporter als auch das Myc-Protein werden durch den Antikörper gebunden und wiegen ca. 62 kDa [208]. Dies erklärt auch die entstandene Bande bei den Zelllysaten aus HCT116 WT. Zur sicheren Expressionskontrolle des Reporterproteins CPFluc (Casp9) sollte daher zukünftig ein Antikörper eingesetzt werden, der direkt gegen die Luciferase gerichtet ist. Weiterhin kann das System durch einen Vergleich mit bereits etablierten Methoden zur Messung einzelner Caspasen weiter validiert werden. Die Methode des TCA kann somit perspektivisch als innovatives Werkzeug zur Untersuchung neuer Wirkstoffe und deren Apoptosesignalwege in Echtzeit dienen.

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Das vorgestellte System zur Detektion maligner Zellen anhand spezifischer Methylierungsmuster stellt eine vielversprechende Methode für zukünftige diagnostische sowie therapeutische Verfahren dar. Auch die neu identifizierten hypermethylierten Biomarker könnten dazu beitragen, die Früherkennung des KKR zu optimieren. Um durch die Sequenzierung die Methylierung des gesamten Genoms und nicht nur ausgewählter CpG-Inseln zu erfassen, wurde ein WGS durchgeführt. Hierbei kann die geringe *Coverage*, welche aus der Verwendung der NextSeq550-Plattform für multiplexierte Sequenzierung von mehreren humanen DNA-Proben resultiert, eine Limitation darstellen [209]. Da die Fragestellung dieser Arbeit jedoch keine sichere Methylierungsbestimmung mit einem Auflösungsvermögen einzelner Cytosinbasen erfordert, sondern vielmehr ganze Regionen betrachtet werden, ist die angewandte Methodik hierfür geeignet [210]. Eine weitere Limitation liegt in der Auswahl der gesunden Kontrollproben, welche überwiegend von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stammen. Wenngleich die Proben aus nicht-entzündeter Schleimhaut entnommen wurden, kann ein *Bias* aufgrund begrenzter Erkenntnisse bezüglich der hierbei vorliegenden epigenetischen Veränderungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden [211,212]. Außerdem werden patientenindividuelle Methylierungsmuster durch die eingeschränkte Auswahl maligner Proben potenziell vernachlässigt [213]. Nachdem die Zelllinien HCT116 WT sowie CaCo2 je nach untersuchten Markern CIMP aufweisen, könnten Ergebnisse hinsichtlich spezifischer Methylierung auf ein Patientenkollektiv ohne CIMP nur eingeschränkt übertragbar sein [214].

Eine weitere Herausforderung liegt in der Funktionsweise des dCas9-Konstrukts, das beim Reportersystem spezifisch an vorgegebene Zielregion binden soll. Teilweise werden jedoch auch andere DNA-Sequenzen erkannt – trotz Minimierung dieser *off-target* Effekte während des sgRNA-Designs durch Verwendung von Algorithmen [109,215]. Zudem könnten somatische Genmutationen die Spezifität der sgRNA-Bindung einschränken, die bei malignen Erkrankungen vermehrt auftreten [216,217]. Da sich solche Mutationen in bestimmten genetischen Regionen häufen, sollten diese beim sgRNA-Design vermieden werden. Relevante Mutations-Hotspots befinden sich beispielsweise innerhalb des Tumorsuppressorgens *TP53* [218]. Um diesen Aspekten Rechnung zu tragen, werden in dieser Arbeit mehrere sgRNA für ein Zielgen eingesetzt. Hierdurch werden Auswirkungen etwaiger Mutationen auf die Funktionsweise des Reportersystems vermindert. Das angewandte Konzept des *Multiplexed*

Targeting ermöglicht zudem die gleichzeitige Untersuchung verschiedener differenziell methylierter Gene, was einen positiven Beitrag zur Robustheit des Reportersystems leistet. Ein weiterer Störfaktor liegt in der verstärkten Methylierung bestimmter Gene im Rahmen anderer nicht-maligner Erkrankungen und durch Umwelteinflüsse (z. B. Rauchen, Luftverschmutzung, Stress), wodurch das entwickelte Reportersystem falsch positive Ergebnisse liefern könnte [219,220]. Die Nutzung von künstlicher Intelligenz sowie von *Deep Learning* Algorithmen könnte diese Einflüsse durch *Epigenetic Profiling* reduzieren, indem zahlreiche große Methylierungsdatensätze analysiert werden. Hierbei könnten Kombinationen aus hypermethylierten Genen identifiziert werden, welche in der Zusammenschau ein charakteristisches epigenetisches Profil für bestimmte Tumorentitäten wie das KRK bilden. Anhand dieser Datensätze könnten unspezifische Methylierungsmuster, die beispielsweise durch genannte Umwelteinflüsse zustande kommen, differenziert und bestehende Datensätze um diese Faktoren bereinigt werden. Abschließend muss in weiterführenden Experimenten gezeigt werden, dass das vorgestellte Reportersystem in gesunden Zelllinien ohne differenzielle Methylierung tatsächlich kein Signal detektiert.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit werden neue hypermethylierte Biomarker-Kandidaten für das KRK identifiziert, welche in weiterführenden Untersuchungen validiert werden können. Durch ihre Integration beispielsweise in Stuhltests könnte die Sensitivität dieser *Screening*-Untersuchungen gesteigert werden. Die Chancen, die sich durch solche Tests der nächsten Generation ergeben, werden zuletzt durch *Imperiale et al.* demonstriert [56]. Da bereits präkanzeröse Adenome Methylierungsalterationen aufweisen können, eignen sich entsprechende Biomarker bereits in diesem Stadium vor Übergang in ein KRK [142]. Insgesamt werden nicht-invasive Früherkennungsmaßnahmen zukünftig vermutlich einen größeren Stellenwert einnehmen und durch ihre breitere Akzeptanz innerhalb der Bevölkerung die Teilnahme an Vorsorgeprogrammen erhöhen [53]. Hieraus kann eine signifikante Reduktion der Mortalität und der krebsassoziierten ökonomischen Belastung resultieren [50,52,54]. Auch unser optimiertes Reportersystem zur Detektion malignen Gewebes nutzt diese hypermethylierten Biomarker. Prospektiv ist ein Einsatz nicht nur beim KRK denkbar, sondern bei sämtlichen malignen Erkrankungen, welche mit einer charakteristischen differenziellen Methylierung einhergehen [221]. Dies wird durch den einfach umzusetzenden Wechsel der

Zielgene bzw. deren sgRNA ermöglicht. In einem nächsten Schritt sollte die Aktivierbarkeit der Luciferase durch die TEV-Protease weiter optimiert werden. Eine mögliche Strategie besteht im Einsatz längerer Linker-Sequenzen, wodurch die Zugänglichkeit der Spaltstelle und somit die Effizienz der Proteasenaktivität verbessert wird.

Neben der Anwendung zur Früherkennung des KRK eröffnet das neu entwickelte System auch innovative therapeutische Ansätze. So könnten Wirkstoffe beispielsweise gezielt in malignen Zellen, die durch Hypermethylierung gekennzeichnet sind, freigesetzt oder aktiviert werden. Hierfür können beispielsweise split-Toxine eingesetzt werden, die erst in den Tumorzellen in aktiver Form vorliegen. *Free et al.* beschreiben den Einsatz einer geteilten Barnase, wobei diese Ribonuklease erst nach ihrer Rekonstitution innerhalb der Zielzellen zur Apoptose führt [222,223]. Die Problematik signifikanter systemischer Nebenwirkungen durch klassische Chemotherapeutika könnte durch derartige Ansätze reduziert werden. Neben dem Einbringen von Toxinen stellt auch eine gezielte Promotor-Demethylierung von Tumorsuppressorgenen eine therapeutische Option dar, da durch wiederhergestellte Proteinexpression antiproliferative Effekte vermittelt werden können [73,78]. Während der Entwicklung hin zu einem therapeutischen System muss untersucht werden, inwieweit die dCas9-DNA-Bindung durch eine verminderte Basenexzisionsreparatur sowie eine reduzierte Transkription des Zielgens mutagene Effekte vermittelt [188,224]. Des Weiteren müssen die Konstrukte möglichst minimal-invasiv in den Zellen des menschlichen Körpers exprimiert werden. Hierfür eignet sich neben der mRNA-Technologie auch die Einbringung mittels viraler Vektoren [225,226]. So werden nicht-pathogene Adeno-assoziierte Viren bereits zur Therapie von Hämophilie A (Roctavian®), B (Hemgenix®) sowie von spinaler Muskelatrophie (Zolgensma™) eingesetzt, indem durch den Vektor funktionelle Genkopien derjenigen Gene zur Verfügung gestellt werden, die bei den Erkrankungen fehlen oder defekt vorliegen [225,227].

Das vorgestellte TCA stellt zudem perspektivisch eine einfache Methode dar, um die Aktivierung der Caspasen durch verschiedenste Einflussfaktoren nachzuvollziehen. Aufgrund der gezeigten minimalen Überlappung der Emissionsspektren muss keine komplexe Auswertung durchgeführt werden, wie sie bei anderen Ansätzen vonnöten ist [90]. Zunächst sollte jedoch eine weiterführende Validierung der Zelllinie HCT116 TCA hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit bereits etablierten Messverfahren durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt eine der häufigsten malignen Erkrankungen dar und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Zur Optimierung der Früherkennung und der Entwicklung innovativer zielgerichteter Therapiemöglichkeiten werden neue Biomarker zur sicheren molekularen Detektion des KRK benötigt. Epigenetische Merkmale wie die DNA-Methylierung bieten hierfür eine vielversprechende Option. Diese tritt bevorzugt in CpG-Inseln innerhalb von Promotorregionen auf und kann so zur verringerten Expression von Tumorsuppressorgen führen, was die Tumorprogression fördert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Reportersystem zur Identifikation malignen Kolongewebes anhand spezifischer Methylierungsmuster etabliert. Es besteht aus zwei Komponenten, die bei Bindung in räumlicher Nähe zueinander einen Komplex aus rekonstituierter splitTEV-Protease und Intein freisetzen. Das erste Konstrukt erkennt hierbei mithilfe der Methyl-Binding-Domain des MBD1-Proteins hypermethylierte CpG-Inseln. Das zweite Element bindet mit einer dCas9 spezifisch an die untersuchte Zielsequenz. Sind dementsprechend die CpG-Inseln nahe der dCas9-Bindungsstelle hypermethyliert, aktiviert die freigesetzte splitTEV-Protease das Lumineszenzprotein flipNluc, dessen emittierte Lumineszenz gemessen werden kann. Das Reportersystem in der ursprünglichen Form weist eine signifikante Signaldifferenz zwischen methylierten und unmethylierten Genen auf, die eigentliche Induktion der flipNluc erfolgt jedoch ineffizient. Indem die Position des kovalent gebundenen Inteins an der splitTEV-Protease geändert wird, kann diese Aktivierung der flipNluc deutlich verbessert werden. Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Position des split-Inteins an der splitTEV-Protease zu einer sterischen Hemmung führt und die Funktion des Enzyms somit beeinträchtigt wird.

Durch *Whole Genome Sequencing* werden zudem differenziell methylierte Regionen identifiziert, die für das Reportersystem eingesetzt werden und als hypermethylierte Biomarker des KRK dienen. Die Sequenzierung umfasst Zelllinien, Organoide sowie primäres Patientenmaterial. Neben bereits bekannten Biomarkern identifizieren wir für das KRK erstmals die Gene *DLX4*, *FOXC2*, *MNX1*, *PCDH7*, *PCDH8*, *RASAL3* und *SIX1* als hypermethyliert. Die Gene *DLX4*, *FOXC2*, *MNX1* und *RASAL3* kodieren für Proteine, die größtenteils als Transkriptionsfaktoren an Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligt sind. *PCDH7* und

PCDH8 kodieren für Proteine der Zell-Zell-Kontakte und werden ebenso wie *SIX1* mit Metastasierung und Invasivität in Verbindung gebracht.

Das entwickelte Reportersystem zur Detektion hypermethylierter CpG-Inseln basiert auf der Aktivierung von Luciferasen durch proteolytische Spaltung. Dieses Prinzip wurde im zweiten Teil der Arbeit auf die Detektion der Caspase-Aktivität übertragen. Dadurch konnte eine Methode zur parallelen Aktivitätsbestimmung der drei Caspasen-3, -8 und -9 in lebenden Zellen und in Echtzeit etabliert werden, die eine gezielte Differenzierung apoptotischer Signalwege ermöglicht. Diese Caspasen werden während der Apoptose aktiviert, wobei eine Fehlregulation unter anderem bei malignen Erkrankungen auftritt. Das sogenannte *Triple Caspase Assay* verwendet drei induzierbare Reporterproteine, die jeweils eine Caspase anhand ihrer Erkennungssequenz registrieren: flip-mNG3A (Casp3), flipNluc (Casp8) sowie CPFluc (Casp9). Nach Validierung der Einzelreporter und erfolgreicher Durchführung eines *Proof of Concept* wurde das System durch lentivirale Transduktion stabil in HCT116 Zellen integriert. Diese Zelllinie bietet perspektivisch neue Möglichkeiten in der Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe, indem sie Einblicke in die Aktivierung von Caspasen unter verschiedenen externen Bedingungen ermöglicht.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit die Etablierung einer Methode zur Identifikation malignen Gewebes anhand hypermethylierter CpG-Inseln am Beispiel des KRK. Das Verfahren ist auf andere Krebsentitäten mit charakteristischen Methylierungsmustern übertragbar. Die Detektion maligner Zellen eröffnet zudem neue therapeutische Ansätze. Darüber hinaus werden bislang unbekannte hypermethylierte Biomarker für das KRK identifiziert und ein System zur parallelen Echtzeit-Messung der Caspase-Aktivität (Caspasen-3, -8 und -9) in lebenden Zellen vorgestellt.

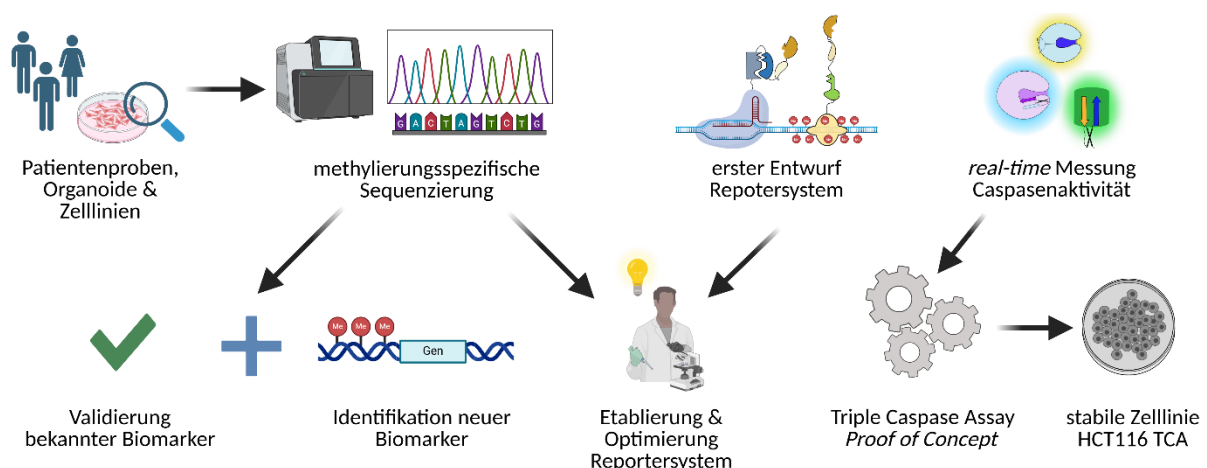


Abbildung 32: Grafische Zusammenfassung der Arbeit.

6 Abkürzungen⁷

(flip-)mNG	(flip) monomeric Neon Green
(flip)Nluc	(flip) Nano Luciferase
5-FU	5-Fluorouracil
5mC	5-Methyl-Cytosin
aa	amino acid
ABT-199	Venetoclax
AID/APOBEC	Activation-Induced Cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide
AK	Antikörper
ALX3	Aristaless-Like Homeobox 3
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
B2M	Beta-2-Microglobulin
BAK	Bcl-2 Antagonist/Killer
BAX	Bcl-2-Associated X Protein
BCAT1	Branched Chain Amino Acid Transaminase 1
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
Bid	BH3 Interacting-Domain Death Agonist
BLU	bioluminescent light unit
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cas9	CRISPR assoziiertes Protein 9
Casp	Caspase
CD95	Cluster of differentiation 95
CEA	Carcinoembryonales Antigen
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPFluc	(circular permutated) Firefly Luciferase
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotidabfolge
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
dCas9	dead Cas 9
DLX4	Distal-Less Homeobox 4
DML	differenziell methylierter CpG-Locus
DMR	differenziell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
Dnmt	DNA-Methyltransferase
DSS	Dispersion shrinkage for sequencing data
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EN1	Engrailed Homeobox 1
EN2	Engrailed Homeobox 2
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule

⁷ Für etablierte Fachbegriffe sowie für Bezeichnungen von Genen wird die englische Sprache verwendet.

FADD	Fas-Associated Death Domain Protein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
fdr	false discovery rate
flipEGFP	flip Enhanced Green Fluorescent Protein
FLU	fluorescence light unit
FOBT	faecal occult blood test
FOXC2	Forkhead Box C2
GAD2	Glutamate Decarboxylase 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GATA5	GATA Binding Protein 5
GPI	Glucose-6-Phosphate Isomerase
GRCh38	Genome Reference Consortium Human Build 38
HDAC	Histone deacetylase
HRP	Horseradish Peroxidase
i.d.R.	in der Regel
IKZF1	IKAROS Family Zinc Finger 1
iPSC	induced pluripotent stem cells
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
K	Konversionsrate
kb	Kilobasen
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
KRK	kolorektales Karzinom
LONRF2	LON Peptidase N-Terminal Domain And Ring Finger 2
LS	Lynch Syndrom
MBD	Methyl-Binding-Domain
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MNX1	Motor Neuron And Pancreas Homeobox 1
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MSH2	DNA Mismatch Repair Protein Msh2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSX1	Msh Homeobox 1
NGS	Next Generation Sequencing
NKX1-1	NK1 homeobox 1
NLS	nuclear localization signal
ns	nicht signifikant
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCDH7	Protocadherin 7
PCDH8	Protocadherin 8
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDX1	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
pp	a posteriori Wahrscheinlichkeit
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
r	Korrelationskoeffizient
RASAL3	RAS Protein Activator Like 3
RNA	ribonucleic acid

ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
RR	relatives Risiko
s.o.	siehe oben
SALL3	Spalt Like Transcription Factor 3
SCTR	Secretin Receptor
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDC2	Syndecan-2
SEM	standard error of the mean
SEPT9	Septin-9
SFRP	Secreted Frizzled-Related Protein
sgRNA	single guide RNA
SIX1	Sine Oculis Homeobox Homolog 1
SLC5A7	Solute Carrier Family 5 Member 7
sog.	sogenannt
SOX1	SRY-Box Transcription Factor 1
SpCas9	Streptococcus pyogenes Cas 9 Endonuklease
SV40	Simian-Virus 40
tBid	truncated Bid
TCA	Triple Caspase (Aktivitäts-)Assay
TEV-Protease	Tobacco Etch Virus Endopeptidase
TET	Ten-eleven translocation
TFPI2	Tissue Factor Pathway Inhibitor 2
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TP53	Tumor Protein P53
TP73	Tumor Protein P73
tracr RNA	trans activating RNA
TRADD	TNFR-Associated Death Domain Protein
UBC	Ubiquitin C
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
VWC2	Von Willebrand Factor C Domain Containing 2
WGS	whole genome sequencing
Wnt	Wingless-related integration site
WT	Wildtyp
β	Beta-Score (relative Häufigkeit methylierter CpG-Loci in definierten Regionen)
κ	Transmissionskoeffizient
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge

7 Literaturverzeichnis

1. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024. 16(8). doi: 10.3390/cancers16081530
2. Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin*. 2025. 75(1):10–45. doi: 10.3322/caac.21871
3. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, Vignat J, Ferlay J, Murphy N, Bray F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023. 72(2):338–44. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327736
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer (WHO) [Zuletzt abgerufen am 11.07.2025]. Verfügbar unter: <https://gco.iarc.fr/today/en>
5. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017. 66(4):683–91. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912
6. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023. 73(3):233–54. doi: 10.3322/caac.21772
7. Wang L, Du M, Wang K, Khandpur N, Rossato SL, Drouin-Chartier J-P, Steele EM, Giovannucci E, Song M, Zhang FF. Association of ultra-processed food consumption with colorectal cancer risk among men and women: results from three prospective US cohort studies. *BMJ*. 2022. e068921. doi: 10.1136/bmj-2021-068921
8. Murphy N, Jenab M, Gunter MJ. Adiposity and gastrointestinal cancers: epidemiology, mechanisms and future directions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018. 15(11):659–70. doi: 10.1038/s41575-018-0038-1
9. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023. 73(1):17–48. doi: 10.3322/caac.21763
10. Meester RGS, Doubeni CA, Zauber AG, Goede SL, Levin TR, Corley DA, Jemal A, Lansdorp-Vogelaar I. Public health impact of achieving 80% colorectal cancer screening rates in the United States by 2018. *Cancer*. 2015. 121(13):2281–5. doi: 10.1002/cncr.29336
11. Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). *Mol Clin Oncol*. 2021. 15(6):271. doi: 10.3892/mco.2021.2433
12. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012. 3(3):153–73. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
13. Rannikmae H, Peel S, Barry S, Senda T, La Roche M de. Mutational inactivation of Apc in the intestinal epithelia compromises cellular organisation. *J Cell Sci*. 2021. 134(2). doi: 10.1242/jcs.250019
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000. 100(1):57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9
15. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, Longacre M. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci*. 2013. 14(10):21087–113. doi: 10.3390/ijms141021087
16. Lotfollahzadeh S, Kashyap S, Tsoris A, Recio-Boiles A, Babiker HM. StatPearls: Rectal Cancer. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL). 2025 [Zuletzt abgerufen am 11.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493202/>

17. Menon G, Recio-Boiles A, Lotfollahzadeh S, Cagir B. StatPearls: Colon Cancer. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL). 2025 [Zuletzt abgerufen am 11.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
18. Nordling CO. A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism. *Br J Cancer*. 1953. 7(1):68–72.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
20. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008. 135(4):1079–99. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.076
21. Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev*. 2018. 37(1):159–72. doi: 10.1007/s10555-017-9725-6
22. Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2011. 192(2):209–18. doi: 10.1083/jcb.201009059
23. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*. 2006. 9(6):288–306. doi: 10.1016/j.drug.2007.01.001
24. Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, Müller M. Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. 394(3):817–23. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.082
25. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992. 358(6381):15–6. doi: 10.1038/358015a0
26. Friedel L, Loewer A. The guardian's choice: how p53 enables context-specific decision-making in individual cells. *FEBS J*. 2022. 289(1):40–52. doi: 10.1111/febs.15767
27. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9(10):749–58. doi: 10.1038/nrc2723
28. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014. 4285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285
29. Sethi I, Romano R-A, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, Sinha S. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 2015. 16584. doi: 10.1186/s12864-015-1793-9
30. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010. 138(6):2073–2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064
31. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer*. 2011. 2(6):607–17. doi: 10.1177/1947601910393957
32. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011. 8(12):686–700. doi: 10.1038/nrgastro.2011.173
33. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, Ukaegbu CI, Brais LK, McNamara PG, Mayer RJ, Schrag D, Meyerhardt JA, Ng K, Kidd J, Singh N, Hartman A-R, Wenstrup RJ, Syngal S. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017. 35(10):1086–95. doi: 10.1200/JCO.2016.71.0012
34. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer*. 2015. 15(3):181–94. doi: 10.1038/nrc3878

35. Hemminki A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Salovaara R, Nyström-Lahti M, La Chapelle A de, Aaltonen LA. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* 1994. 8(4):405–10. doi: 10.1038/ng1294-405.
36. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, Guimbaud R, Buecher B, Bignon Y-J, Caron O, Colas C, Noguès C, Lejeune-Dumoulin S, Olivier-Faivre L, Polycarpe-Osaer F, Nguyen TD, Desseigne F, Saurin J-C, Berthet P, Leroux D, Duffour J, Manouvrier S, Frébourg T, Sobol H, Lasset C, Bonaïti-Pellié C. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA.* 2011. 305(22):2304–10. doi: 10.1001/jama.2011.743
37. DGVS. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom: Version 2.1. 2019 [Zuletzt abgerufen am 11.07.2025]. Verfügbar unter: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/021-007OL>
38. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009. 422. doi: 10.1186/1750-1172-4-22
39. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev.* 2010. 11(1):19–30. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00613.x
40. Silveira EA, Mendonça CR, Delpino FM, Elias Souza GV, Pereira de Souza Rosa L, Oliveira C de, Noll M. Sedentary behavior, physical inactivity, abdominal obesity and obesity in adults and older adults: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN.* 2022. 5063–73. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.06.001
41. Hua H, Jiang Q, Sun P, Xu X. Risk factors for early-onset colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Front Oncol.* 2023. 131132306. doi: 10.3389/fonc.2023.1132306
42. Veettil SK, Wong TY, Loo YS, Playdon MC, Lai NM, Giovannucci EL, Chaiyakunapruk N. Role of Diet in Colorectal Cancer Incidence: Umbrella Review of Meta-analyses of Prospective Observational Studies. *JAMA Netw Open.* 2021. 4(2):e2037341. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.37341
43. Tsoi KKF, Pau CYY, Wu WKK, Chan FKL, Griffiths S, Sung JJY. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009. 7(6):682-688.e1-5. doi: 10.1016/j.cgh.2009.02.016
44. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P, Jenab M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011. 22(9):1958–72. doi: 10.1093/annonc/mdq653
45. Zhou X, Wang L, Xiao J, Sun J, Yu L, Zhang H, Meng X, Yuan S, Timofeeva M, Law PJ, Houlston RS, Ding K, Dunlop MG, Theodoratou E, Li X. Alcohol consumption, DNA methylation and colorectal cancer risk: Results from pooled cohort studies and Mendelian randomization analysis. *Int J Cancer.* 2022. 151(1):83–94. doi: 10.1002/ijc.33945
46. Gupta S. Screening for Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022. 36(3):393–414. doi: 10.1016/j.hoc.2022.02.001
47. Ballinger AB, Anggiansah C. Colorectal cancer. *BMJ.* 2007. 335(7622):715–8. doi: 10.1136/bmj.39321.527384.BE
48. Tong G, Xu W, Zhang G, Liu J, Zheng Z, Chen Y, Niu P, Xu X. The role of tissue and serum carcinoembryonic antigen in stages I to III of colorectal cancer—A retrospective cohort study. *Cancer Med.* 2018. 7(11):5327–38. doi: 10.1002/cam4.1814

49. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020. 158(2):291–302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059
50. Zheng S, Schrijvers JJA, Greuter MJW, Kats-Ugurlu G, Lu W, Bock GH de. Effectiveness of Colorectal Cancer (CRC) Screening on All-Cause and CRC-Specific Mortality Reduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2023. 15(7). doi: 10.3390/cancers15071948
51. Bretthauer M, Løberg M, Wieszczy P, Kalager M, Emilsson L, Garborg K, Rupinski M, Dekker E, Spaander M, Bugajski M, Holme Ø, Zauber AG, Pilonis ND, Mroz A, Kuipers EJ, Shi J, Hernán MA, Adami H-O, Regula J, Hoff G, Kaminski MF. Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *N Engl J Med*. 2022. 387(17):1547–56. doi: 10.1056/NEJMoa2208375
52. Ran T, Cheng C-Y, Misselwitz B, Brenner H, Ubels J, Schlander M. Cost-Effectiveness of Colorectal Cancer Screening Strategies-A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019. 17(10):1969-1981.e15. doi: 10.1016/j.cgh.2019.01.014
53. Adler A, Geiger S, Keil A, Bias H, Schatz P, deVos T, Dhein J, Zimmermann M, Tauber R, Wiedenmann B. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany. *BMC Gastroenterol*. 2014. 14:183. doi: 10.1186/1471-230X-14-183
54. Blom J, Saraste D, Törnberg S, Jonsson H. Routine Fecal Occult Blood Screening and Colorectal Cancer Mortality in Sweden. *JAMA Netw Open*. 2024. 7(2):e240516. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2024.0516
55. Zygulska AL, Pierzchalski P. Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(2). doi: 10.3390/ijms23020852
56. Imperiale TF, Porter K, Zella J, Gagrut ZD, Olson MC, Statz S, Garces J, Lavin PT, Aguilar H, Brinberg D, Berkelhammer C, Kisiel JB, Limburg PJ. Next-Generation Multitarget Stool DNA Test for Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2024. 390(11):984–93. doi: 10.1056/NEJMoa2310336
57. Chen B, Zhao H, Hu H, Shang H, Wang H, Yao Z, Huang J, Lv H, Xu W, Wang J, Nie C, Zhao J, He Y, Wang S, Chen X. Circulating DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2025. 15(1):13577. doi: 10.1038/s41598-025-95712-5
58. Grancher A, Michel P, Di Fiore F, Sefrioui D. Colorectal cancer chemoprevention: is aspirin still in the game? *Cancer Biol Ther*. 2022. 23(1):446–61. doi: 10.1080/15384047.2022.2104561
59. Hofheinz R-D, Arnold D, Borner M, Faber G, Folprecht G, Graeven U, Grünberger B, Hebart H, Hegewisch-Becker S, Heinemann V, Pritzkeleit R, Rumpold H, Sinn M, Weitz J, Wörmann B. Kolonkarzinom: C18.-. 2025 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom>
60. Elez E, Yoshino T, Shen L, Lonardi S, van Cutsem E, Eng C, Kim TW, Wasan HS, Desai J, Ciardiello F, Yaeger R, Maughan TS, van Morris K, Wu C, Usari T, Laliberte R, Dychter SS, Zhang X, Tabernero J, Kopetz S. Encorafenib, Cetuximab, and mFOLFOX6 in BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2025. 392(24):2425–37. doi: 10.1056/NEJMoa2501912
61. Drott J, Starkhammar H, Kjellgren K, Berterö C. Neurotoxic Side Effects Early in the Oxaliplatin Treatment Period in Patients With Colorectal Cancer. *Oncol Nurs Forum*. 2018. 45(6):690–7. doi: 10.1188/18.ONF.690-697
62. Aoullay Z, Slaoui M, Razine R, Er-Raki A, Meddah B, Cherrah Y. Therapeutic Characteristics, Chemotherapy-Related Toxicities and Survivorship in Colorectal Cancer Patients. *Ethiop J Health Sci*. 2020. 30(1):65–74. doi: 10.4314/ejhs.v30i1.9

63. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013. 38(1):23–38. doi: 10.1038/npp.2012.112
64. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983. 301(5895):89–92. doi: 10.1038/301089a0
65. Cervena K, Siskova A, Buchler T, Vodicka P, Vymetalkova V. Methylation-Based Therapies for Colorectal Cancer. *Cells*. 2020. 9(6). doi: 10.3390/cells9061540
66. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982. 10(8):2709–21.
67. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011. 473(7347):398–402. doi: 10.1038/nature10008
68. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992. 69(6):915–26. doi: 10.1016/0092-8674(92)90611-f.
69. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999. 99(3):247–57. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81656-6.
70. Gebhard C, Benner C, Ehrlich M, Schwarzfischer L, Schilling E, Klug M, Dietmaier W, Thiede C, Holler E, Andreesen R, Rehli M. General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Res*. 2010. 70(4):1398–407. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3406
71. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011. 146(6):866–72. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042
72. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CPE, Shen H, Byun H-M, van den Berg D, Malik S, Pan F, Noshmehr H, van Dijk CM, Tollenaar RAEM, Laird PW. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res*. 2012. 22(2):271–82. doi: 10.1101/gr.117523.110
73. Ashktorab H, Brim H. DNA Methylation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2014. 10(4):425–30. doi: 10.1007/s11888-014-0245-2
74. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*. 2001. 20(48):7120–7. doi: 10.1038/sj.onc.1204891
75. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, Reyniès A de, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, Sousa E Melo F de, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015. 21(11):1350–6. doi: 10.1038/nm.3967
76. Song L, Guo S, Wang J, Peng X, Jia J, Gong Y, Yang B, Xiao W, Dong C, Liu H, Li Y. The blood mSEPT9 is capable of assessing the surgical therapeutic effect and the prognosis of colorectal cancer. *Biomark Med*. 2018. 12(9):961–73. doi: 10.2217/bmm-2018-0012
77. Sung CK, Yim H. CRISPR-mediated Promoter De/Methylation Technologies for Gene Regulation. *Arch Pharm Res*. 2020. 43(7):705–13. doi: 10.1007/s12272-020-01257-8

78. Li Y, Liu B, Yin X, Jiang Z, Fang C, Chen N, Zhang B, Dai L, Yin Y. Targeted demethylation of the SLC5A7 promotor inhibits colorectal cancer progression. *Clin Epigenetics*. 2022. 14(1):92. doi: 10.1186/s13148-022-01308-5
79. Gallimore F, Fandy TE. Therapeutic Applications of Azanucleoside Analogs as DNA Demethylating Agents. *Epigenomes*. 2023. 7(3). doi: 10.3390/epigenomes7030012
80. Volz B. Novel strategy to distinguish healthy from tumour genetic tissue by recognising specific DNA methylation patterns [Master's Thesis]. Regensburg. Universität Regensburg. 2022.
81. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013. 152(5):1173–83. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
82. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012. 337(6096):816–21. doi: 10.1126/science.1225829
83. Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M. Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol*. 2000. 20(14):5107–18. doi: 10.1128/mcb.20.14.5107-5118.2000
84. Langan RA, Boyken SE, Ng AH, Samson JA, Dods G, Westbrook AM, Nguyen TH, Lajoie MJ, Chen Z, Berger S, Mulligan VK, Dueber JE, Novak WRP, El-Samad H, Baker D. De novo design of bioactive protein switches. *Nature*. 2019. 572(7768):205–10. doi: 10.1038/s41586-019-1432-8
85. Aranko A, Wlodawer A, Iwai H. Nature's recipe for splitting inteins. *Protein Eng Des Sel*. 2014. 27(8):263–71. doi: 10.1093/protein/gzu028
86. Truong D-JJ, Phlairaharn T, Eßwein B, Gruber C, Tümen D, Baligács E, Armbrust N, Vaccaro FL, Lederer E-M, Beck EM, Geilenkeuser J, Göppert S, Krumwiede L, Grätz C, Raffl G, Schwarz D, Zirngibl M, Živanić M, Beyer M, Körner JD, Santl T, Evsyukov V, Strauß T, Schwarz SC, Höglinger GU, Heutink P, Doll S, Conrad M, Giesert F, Wurst W, Westmeyer GG. Non-invasive and high-throughput interrogation of exon-specific isoform expression. *Nat Cell Biol*. 2021. 23(6):652–63. doi: 10.1038/s41556-021-00678-x
87. Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünewald S, Scheek S, Bach A, Nave K-A, Rossner MJ. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nature methods*. 2006. 3(12):985–93. doi: 10.1038/nmeth967
88. England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem*. 2016. 27(5):1175–87. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112
89. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P, Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, Roberts MB, Benink HA, Eggers CT, Slater MR, Meisenheimer PL, Klaubert DH, Fan F, Encell LP, Wood KV. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*. 2012. 7(11):1848–57. doi: 10.1021/cb3002478
90. Sarrion-Perdigones A, Chang L, Gonzalez Y, Gallego-Flores T, Young DW, Venken KJT. Examining multiple cellular pathways at once using multiplex hexuple luciferase assaying. *Nat Commun*. 2019. 10(1):5710. doi: 10.1038/s41467-019-13651-y
91. Zhang Q, Schepis A, Huang H, Yang J, Ma W, Torra J, Zhang S-Q, Yang L, Wu H, Nonell S, Dong Z, Kornberg TB, Coughlin SR, Shu X. Designing a Green Fluorogenic Protease Reporter by Flipping a Beta Strand of GFP for Imaging Apoptosis in Animals. *J Am Chem Soc*. 2019. 141(11):4526–30. doi: 10.1021/jacs.8b13042

92. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
93. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015. 22(4):526–39. doi: 10.1038/cdd.2014.216
94. van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019. 50(6):1352–64. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.020
95. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017. 24(8):1380–9. doi: 10.1038/cdd.2017.44
96. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000. 407(6805):789–95. doi: 10.1038/35037728
97. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998. 94(4):491–501. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81590-1
98. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998. 94(4):481–90. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81589-5
99. Kunst C, Tümen D, Ernst M, Tews HC, Müller M, Gülow K. Paraptosis-A Distinct Pathway to Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2024. 25(21). doi: 10.3390/ijms252111478
100. Wigdal SS, Anderson JL, Vidugiris GJ, Shultz J, Wood KV, Fan F. A novel bioluminescent protease assay using engineered firefly luciferase. *Curr Chem Genomics.* 2008. 216–28. doi: 10.2174/1875397300802010016
101. Zhou S, Feng S, Brown D, Huang B. Improved yellow-green split fluorescent proteins for protein labeling and signal amplification. *PLoS One.* 2020. 15(11):e0242592. doi: 10.1371/journal.pone.0242592
102. Shaner NC, Lambert GG, Chammas A, Ni Y, Cranfill PJ, Baird MA, Sell BR, Allen JR, Day RN, Israelsson M, Davidson MW, Wang J. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature methods.* 2013. 10(5):407–9. doi: 10.1038/nmeth.2413
103. McStay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 2008. 15(2):322–31. doi: 10.1038/sj.cdd.4402260
104. Zhra M, Qasem RJ, Aldossari F, Saleem R, Aljada A. A Comprehensive Exploration of Caspase Detection Methods: From Classical Approaches to Cutting-Edge Innovations. *Int J Mol Sci.* 2024. 25(10). doi: 10.3390/ijms25105460
105. Shroff J, Thosani N, Batra S, Singh H, Guha S. Reduced incidence and mortality from colorectal cancer with flexible-sigmoidoscopy screening: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2014. 20(48):18466–76. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18466
106. Cavalcante RG, Sartor MA. annotatr: genomic regions in context. *Bioinformatics.* 2017. 33(15):2381–3. doi: 10.1093/bioinformatics/btx183
107. Raymond G. Cavalcante , Maureen A. Sartor. annotatr: Bioconductor. 2017.
108. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics.* 2011. 27(11):1571–2. doi: 10.1093/bioinformatics/btr167
109. Concordet J-P, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(W1):W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354

110. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 2011. 17(1):10. doi: 10.14806/ej.17.1.200
111. Feng H, Conneely KN, Wu H. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014. 42(8):e69. doi: 10.1093/nar/gku154
112. Feng H, Wu H. Differential methylation analysis for bisulfite sequencing using DSS. *Quant Biol.* 2019. 7(4):327–34. doi: 10.1007/s40484-019-0183-8
113. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Babraham Institute. 2010 [Zuletzt abgerufen am 07.06.2025]. Verfügbar unter: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
114. Felix Krueger, Frankie James, Phil Ewels, Ebrahim Afyounian, Michael Weinstein, Benjamin Schuster-Boeckler, Gert Hulselmans, sclamons. FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.10 - add default decompression path: Zenodo. 2023.
115. Hoppers A, Williams L, Ponnaluri VKC, Sexton B, Saleh L, Campbell M, Marks K, Samaranayake M, Ettwiller L, Guan S, Church H, Langhorst B, Sun Z, Evans TC, Vaisvila R, Dimalanta E, Stewart F. Enzymatic Methyl-seq: Next Generation Methylomes. *J Biomol Tech.* 2020. 31(Suppl):S15.
116. Martin FJ, Amode MR, Aneja A, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Becker A, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bhurji SK, Bignell A, Boddu S, Branco Lins PR, Brooks L, Ramaraju SB, Charkhchi M, Cockburn A, Da Rin Fiorretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui B, El Naboulsi T, Fatima R, Giron CG, Genez T, Ghattaoraya GS, Martinez JG, Guijarro C, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Kay M, Kaykala V, Le T, Lemos D, Marques-Coelho D, Marugán JC, Merino GA, Mirabueno LP, Mushtaq A, Hossain SN, Ogeh DN, Sakthivel MP, Parker A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Pérez-Silva JG, Salam AIA, Saraiva-Agostinho N, Schuilenburg H, Sheppard D, Sinha S, Sipos B, Stark W, Steed E, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner M-M, Surapaneni L, Sutinen K, Szpak M, Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Wass E, Willhoft N, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Chakiachvili M, Flint B, Giorgetti S, Haggerty L, Ilesley GR, Loveland JE, Moore B, Mudge JM, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Winterbottom A, Frankish A, Hunt SE, Ruffier M, Cunningham F, Dyer S, Finn RD, Howe KL, Harrison PW, Yates AD, Flicek P. Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023. 51(D1):D933-D941. doi: 10.1093/nar/gkac958
117. What levels of conversion are typical with the control DNAs supplied in the EM-seq kit? [Zuletzt abgerufen am 11.07.2025]. Verfügbar unter: <https://international.neb.com/faqs/2019/06/04/what-levels-of-conversion-are-typical-with-the-control-dnas-supplied-in-the-em-seq-kit>
118. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018. 68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492
119. Klimeck L, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H. Colorectal cancer: A health and economic problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2023. 66101839. doi: 10.1016/j.bpg.2023.101839
120. Hofmarcher T, Lindgren P. The Cost of Cancers of the Digestive System in Europe. IHE Report. Lund, Schweden. 2020 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: https://digestivecancers.eu/wp-content/uploads/2020/10/IHE_DiCE_HealthEcoStudy_2020.pdf
121. Ladabaum U, Dominitz JA, Kahi C, Schoen RE. Strategies for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology.* 2020. 158(2):418–32. doi: 10.1053/j.gastro.2019.06.043

122. Wu W, Huang J, Yang Y, Gu K, Luu HN, Tan S, Yang C, Fu J, Bao P, Ying T, Withers M, Mao D, Chen S, Gong Y, Wong MCS, Xu W. Adherence to colonoscopy in cascade screening of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022. 37(4):620–31. doi: 10.1111/jgh.15762
123. CMS – Centers for Medicare & Medicaid Services. National Coverage Determination for Screening for Colorectal Cancer-Blood-Based Biomarker Tests. 2021 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.cms.gov/medicare-coverage-database/view/ncacal-decision-memo.aspx?proposed=N&NCAId=299>
124. Jensen SØ, Øgaard N, Ørntoft M-BW, Rasmussen MH, Bramsen JB, Kristensen H, Mouritzen P, Madsen MR, Madsen AH, Sunesen KG, Iversen LH, Laurberg S, Christensen IJ, Nielsen HJ, Andersen CL. Novel DNA methylation biomarkers show high sensitivity and specificity for blood-based detection of colorectal cancer-a clinical biomarker discovery and validation study. *Clin Epigenetics*. 2019. 11(1):158. doi: 10.1186/s13148-019-0757-3.
125. Kong C, Fu T. Value of methylation markers in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2021. 46(2). doi: 10.3892/or.2021.8128
126. Yang AS, Estéicio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa J-PJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004. 32(3):e38. doi: 10.1093/nar/gnh032
127. Fan S, Zhang X. CpG island methylation pattern in different human tissues and its correlation with gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 383(4):421–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.023
128. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009. 16(5):564–71. doi: 10.1038/nsmb.1594
129. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006. 6(2):107–16. doi: 10.1038/nrc1799
130. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003. 349(21):2042–54. doi: 10.1056/NEJMra023075
131. Zhou L, Ng HK, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Beck S, Kim C, Chambers JC, Loh M. Systematic evaluation of library preparation methods and sequencing platforms for high-throughput whole genome bisulfite sequencing. *Sci Rep*. 2019. 9(1):10383. doi: 10.1038/s41598-019-46875-5
132. Herman JG, Baylin SB. Methylation-specific PCR. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001. Chapter 10Unit 10.6. doi: 10.1002/0471142905.hg1006s16
133. Peters TJ, Buckley MJ, Chen Y, Smyth GK, Goodnow CC, Clark SJ. Calling differentially methylated regions from whole genome bisulphite sequencing with DMRcate. *Nucleic Acids Res*. 2021. 49(19):e109. doi: 10.1093/nar/gkab637
134. Mori Y, Olaru AV, Cheng Y, Agarwal R, Yang J, Luvsanjav D, Yu W, Selaru FM, Hutfless S, Lazarev M, Kwon JH, Brant SR, Marohn MR, Hutcheon DF, Duncan MD, Goel A, Meltzer SJ. Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning. *Endocr Relat Cancer*. 2011. 18(4):465–78. doi: 10.1530/ERC-11-0083
135. Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*. 2006. 38(5):540–9. doi: 10.1038/ng1781
136. Mayor R, Casadomé L, Azuara D, Moreno V, Clark SJ, Capellà G, Peinado MA. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application

- as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer*. 2009. 100(10):1534–9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605045
137. Lee Y, Dho SH, Lee J, Hwang J-H, Kim M, Choi W-Y, Lee J-Y, Lee J, Chang W, Lee MY, Choi J, Kim T-Y, Kim LK. Hypermethylation of PDX1, EN2, and MSX1 predicts the prognosis of colorectal cancer. *Exp Mol Med*. 2022. 54(2):156–68. doi: 10.1038/s12276-022-00731-1
 138. Li H, Du Y, Zhang D, Wang L-N, Yang C, Liu B, Wang W-J, Shi L, Hong W-G, Zhang L, Yang Y-X. Identification of novel DNA methylation markers in colorectal cancer using MIRA-based microarrays. *Oncol Rep*. 2012. 28(1):99–104. doi: 10.3892/or.2012.1779
 139. Hellebrekers DMEI, Lentjes MHFM, van den Bosch SM, Melotte V, Wouters KAD, Daenen KLJ, Smits KM, Akiyama Y, Yuasa Y, Sanduleanu S, Khalid-de Bakker CAJ, Jonkers D, Weijenberg MP, Louwagie J, van Criekinge W, Carvalho B, Meijer GA, Baylin SB, Herman JG, Bruïne AP de, van Engeland M. GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009. 15(12):3990–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0055
 140. Javierre BM, Rodriguez-Ubreva J, Al-Shahrour F, Corominas M, Graña O, Ciudad L, Agirre X, Pisano DG, Valencia A, Roman-Gomez J, Calasanz MJ, Prosper F, Esteller M, Gonzalez-Sarmiento R, Ballestar E. Long-range epigenetic silencing associates with deregulation of Ikaros targets in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2011. 9(8):1139–51. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0515
 141. Pedersen SK, Symonds EL, Baker RT, Murray DH, McEvoy A, van Doorn SC, Mundt MW, Cole SR, Gopalsamy G, Mangira D, LaPointe LC, Dekker E, Young GP. Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia. *BMC Cancer*. 2015. 15:654. doi: 10.1186/s12885-015-1674-2.
 142. Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtröder K, Sørensen KD, Laurberg S, Orntoft TF, Andersen CL. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*. 2011. 129(12):2855–66. doi: 10.1002/ijc.25951
 143. Hua Y, Ma X, Liu X, Yuan X, Qin H, Zhang X. Abnormal expression of mRNA, microRNA alteration and aberrant DNA methylation patterns in rectal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2017. 12(3):e0174461. doi: 10.1371/journal.pone.0174461
 144. Molnár B, Galamb O, Péterfia B, Wichmann B, Csabai I, Bodor A, Kalmár A, Szigeti KA, Barták BK, Nagy ZB, Valcz G, Patai ÁV, Igaz P, Tulassay Z. Gene promoter and exon DNA methylation changes in colon cancer development - mRNA expression and tumor mutation alterations. *BMC Cancer*. 2018. 18(1):695. doi: 10.1186/s12885-018-4609-x
 145. Zhang C, Zhao H, Li J, Liu H, Wang F, Wei Y, Su J, Zhang D, Liu T, Zhang Y. The identification of specific methylation patterns across different cancers. *PLoS One*. 2015. 10(3):e0120361. doi: 10.1371/journal.pone.0120361
 146. Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, Kim TS, Kim NK, Chung HC, An S. Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2013. 15(4):498–507. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.03.004.
 147. Huang J, Tan Z-R, Yu J, Li H, Lv Q-L, Shao Y-Y, Zhou H-H. DNA hypermethylated status and gene expression of PAX1/SOX1 in patients with colorectal carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2017. 10:4739–51. doi: 10.2147/OTT.S143389
 148. Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, van Neste L, Louwagie J, Chan TA, Kleeberger W, Bruïne AP de, Smits KM, Khalid-de Bakker CAJ, Jonkers DMAE, Stockbrügger RW, Meijer GA, Oort

- FA, Iacobuzio-Donahue C, Bierau K, Herman JG, Baylin SB, van Engeland M, Schuebel KE, Ahuja N. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2009. 69(11):4691–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0142
149. Cheng X-H, Xu T-T, Zhou L-B, Li F-Y, Wang S, Liang H-R, Tang J-J, Duan C-Q, Jiang H, Zhang Y-F, Liu Z-N. SUMO1-modified DNA methyltransferase 1 induces DNA hypermethylation of VWC2 in the development of colorectal cancer. *Neoplasma.* 2022. 69(6):1373–85. doi: 10.4149/neo_2022_220817N841
 150. Zhang W, Yang C, Wang S, Xiang Z, Dou R, Lin Z, Zheng J, Xiong B. SDC2 and TFPI2 Methylation in Stool Samples as an Integrated Biomarker for Early Detection of Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021. 133601–17. doi: 10.2147/CMAR.S300861
 151. Li J-K, Liu H, Zhang H-W, Li J, Liang Z-T. A Positive Feedback Loop of E2F4-Mediated Activation of MNX1 Regulates Tumour Progression in Colorectal Cancer. *J Cancer.* 2023. 14(14):2739–50. doi: 10.7150/jca.86718
 152. Beukers W, Hercegovic A, Vermeij M, Kandimalla R, Blok AC, van der Aa MMN, Zwarthoff EC, Zuiverloon TCM. Hypermethylation of the polycomb group target gene PCDH7 in bladder tumors from patients of all ages. *J Urol.* 2013. 190(1):311–6. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.078.
 153. Lin Y-L, Wang Y-L, Fu X-L, Ma J-G. Aberrant methylation of PCDH8 is a potential prognostic biomarker for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Med Sci Monit.* 2014. 202380–5. doi: 10.12659/MSM.892433.
 154. Lin Y-L, Wang Y-L, Ma J-G, Li W-P. Clinical significance of protocadherin 8 (PCDH8) promoter methylation in non-muscle invasive bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014. 33(1):68. doi: 10.1186/s13046-014-0068-7.
 155. Zhang C, Peng Y, Yang F, Qin R, Liu W, Zhang C. PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance. *J Cancer.* 2016. 7(4):446–52. doi: 10.7150/jca.13065
 156. Zhang T-J, Zhou J-D, Yang D-Q, Wang Y-X, Yao D-M, Ma J-C, Wen X-M, Guo H, Lin J, Qian J. Hypermethylation of DLX4 predicts poor clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Chem Lab Med.* 2016. 54(5):865–71. doi: 10.1515/cclm-2015-0536.
 157. Zhou J-D, Zhang T-J, Wang Y-X, Yang D-Q, Yang L, Ma J-C, Wen X-M, Yang J, Lin J, Qian J. DLX4 hypermethylation is a prognostically adverse indicator in de novo acute myeloid leukemia. *Tumour Biol.* 2016. 37(7):8951–60. doi: 10.1007/s13277-015-4364-4
 158. Rafiq A, Aashaq S, Jan I, Beigh MA. SIX1 transcription factor: A review of cellular functions and regulatory dynamics. *Int J Biol Macromol.* 2021. 193(Pt B):1151–64. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.133
 159. Matas J, Kohn B, Fredrickson J, Carter K, Yu M, Wang T, Gui X, Soussi T, Moreno V, Grady WM, Peinado MA, Risques RA. Colorectal Cancer Is Associated with the Presence of Cancer Driver Mutations in Normal Colon. *Cancer Res.* 2022. 82(8):1492–502. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3607
 160. Ohsugi T, Yamaguchi K, Zhu C, Ikenoue T, Furukawa Y. Decreased expression of interferon-induced protein 2 (IFIT2) by Wnt/ β -catenin signaling confers anti-apoptotic properties to colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 2017. 8(59):100176–86. doi: 10.18632/oncotarget.22122
 161. Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, Bialasek M, Krol M. Wnt signaling pathway in development and cancer. *J Physiol Pharmacol.* 2018. 69(2). doi: 10.26402/jpp.2018.2.07

162. Hu Y-H, Chen Q, Lu Y-X, Zhang J-M, Lin C, Zhang F, Zhang W-J, Li X-M, Zhang W, Li X-N. Hypermethylation of NDN promotes cell proliferation by activating the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017. 8(28):46191–203. doi: 10.18632/oncotarget.17580
163. Jalilvand A, Soltanpour MS. Promoter Hypermethylation of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway Inhibitor WIF-1 Gene and its Association with MTHFR C677T Polymorphism in Patients with Colorectal Cancer. *Oman Med J*. 2020. 35(3):e131. doi: 10.5001/omj.2020.49
164. Suzuki H, Watkins DN, Jair K-W, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004. 36(4):417–22. doi: 10.1038/ng1330
165. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009. 17(1):9–26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016
166. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994. 1198(1):11–26. doi: 10.1016/0304-419x(94)90003-5.
167. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 2008. 27(55):6920–9. doi: 10.1038/onc.2008.343
168. Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, Mortensen NJ, Kmiet W, Playford RJ, Pignatelli M, Bodmer WF. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(5):2316–21. doi: 10.1073/pnas.96.5.2316
169. Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S, Nagawa H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Int J Cancer*. 2002. 102(3):225–9. doi: 10.1002/ijc.10690
170. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004. 64(15):5245–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
171. Kheirleiseid EAH, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol*. 2010. 1112. doi: 10.1186/1471-2199-11-12
172. Di Blasi R, Marbiah MM, Siciliano V, Polizzi K, Ceroni F. A call for caution in analysing mammalian co-transfection experiments and implications of resource competition in data misinterpretation. *Nat Commun*. 2021. 12(1):2545. doi: 10.1038/s41467-021-22795-9
173. Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, Siciliano V. Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun*. 2020. 11(1):4641. doi: 10.1038/s41467-020-18392-x
174. Boye C, Arpag S, Francis M, DeClemente S, West A, Heller R, Bulysheva A. Reduction of plasmid vector backbone length enhances reporter gene expression. *Bioelectrochemistry*. 2022. 144107981. doi: 10.1016/j.bioelechem.2021.107981
175. Antczak C, Mahida JP, Singh C, Calder PA, Djaballah H. A high content assay to assess cellular fitness. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2014. 17(1):12–24. doi: 10.2174/13862073113169990056

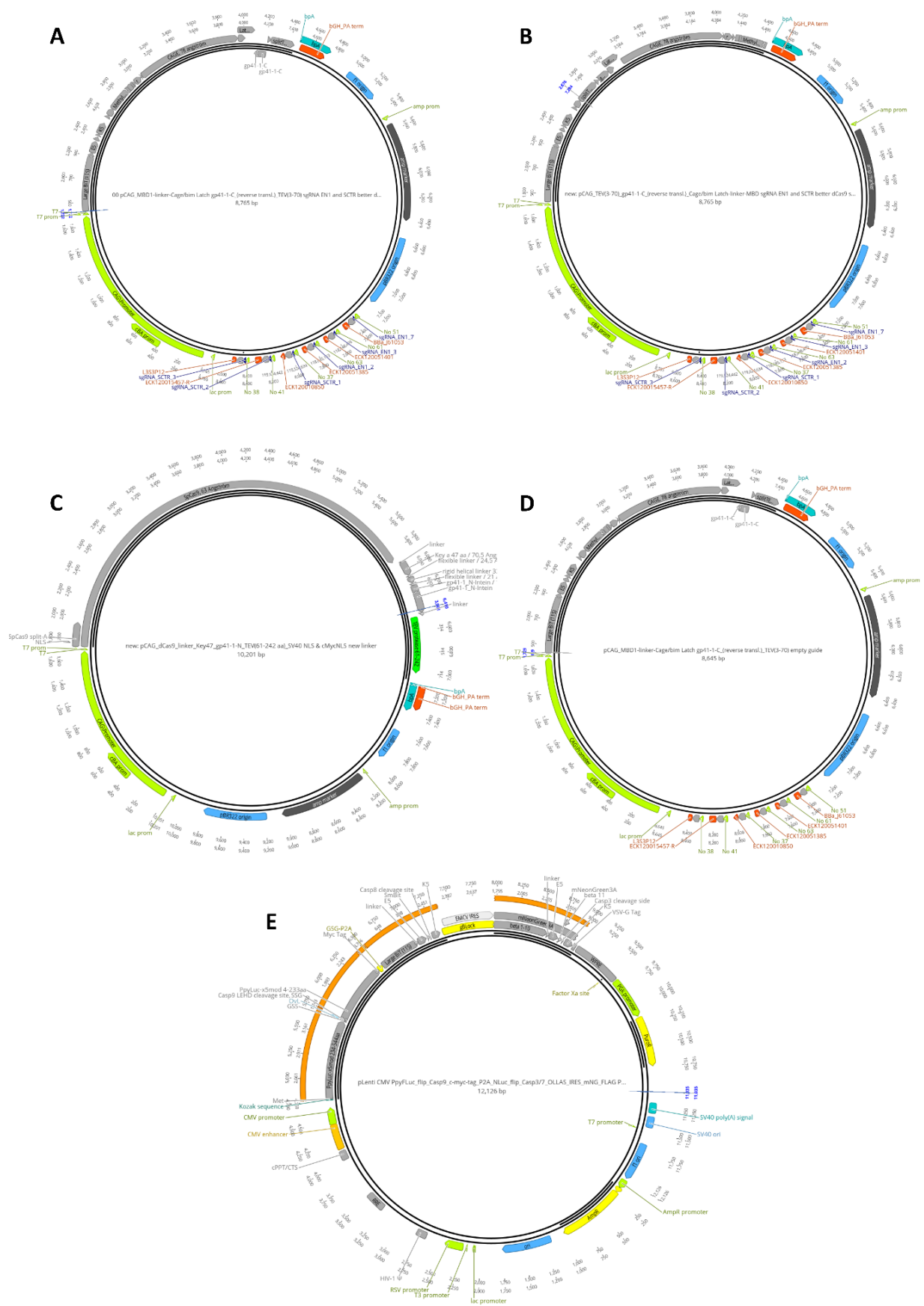
176. Huliák I, Sike A, Zencir S, Boros IM. The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects reporter gene expression in transient transfection experiments. *DNA Cell Biol.* 2012. 31(11):1580–4. doi: 10.1089/dna.2012.1711
177. Marenzi S, Adams RL, Zardo G, Lenti L, Reale A, Caiafa P. Efficiency of expression of transfected genes depends on the cell cycle. *Mol Biol Rep.* 1999. 26(4):261–7. doi: 10.1023/a:1007009022336
178. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(D1):D624–D632. doi: 10.1093/nar/gkx1134
179. Roy M, Rawat A, Kaushik S, Jyoti A, Srivastava VK. Endogenous cysteine protease inhibitors in upmost pathogenic parasitic protozoa. *Microbiol Res.* 2022. 261127061. doi: 10.1016/j.micres.2022.127061
180. Beyer HM, Mikula KM, Li M, Wlodawer A, Iwai H. The crystal structure of the naturally split gp41-1 intein guides the engineering of orthogonal split inteins from cis-splicing inteins. *FEBS J.* 2020. 287(9):1886–98. doi: 10.1111/febs.15113
181. Yu X, Sun J, Wang W, Jiang L, Wang R, Xiao W, Cheng B, Fan J. Tobacco etch virus protease mediating cleavage of the cellulose-binding module tagged colored proteins immobilized on the regenerated amorphous cellulose. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017. 40(7):1101–10. doi: 10.1007/s00449-017-1772-4
182. Zhu K, Zhou X, Yan Y, Mo H, Xie Y, Cheng B, Fan J. Cleavage of fusion proteins on the affinity resins using the TEV protease variant. *Protein Expr Purif.* 2017. 13127–33. doi: 10.1016/j.pep.2016.02.003
183. Arai R, Ueda H, Kitayama A, Kamiya N, Nagamune T. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng.* 2001. 14(8):529–32. doi: 10.1093/protein/14.8.529
184. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013. 31(9):827–32. doi: 10.1038/nbt.2647
185. Thermo Fisher Scientific. A step-by-step guide to successful chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. 2016 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-application-notes/step-by-step-guide-successful-chip-assays.html>
186. Active Motif. Cas9 antibody datasheet (Clone 8C1-F10, Catalog No 61757) [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.activemotif.com/documents/tds/61757.pdf>
187. Thermo Fisher Scientific. Pierce Magnetic ChIP Kit - Instructions. 2016 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016150_PierceMagneticChIPKit_PI.pdf
188. Antony JS, Roberts SA, Wyrick JJ, Hinz JM. dCas9 binding inhibits the initiation of base excision repair in vitro. *DNA Repair (Amst).* 2022. 109103257. doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103257
189. Sundaresan R, Parameshwaran HP, Yogesha SD, Keilbarth MW, Rajan R. RNA-Independent DNA Cleavage Activities of Cas9 and Cas12a. *Cell Rep.* 2017. 21(13):3728–39. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.100.

190. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001. 41:367–401. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367
191. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994. 73(8):2013–26. doi: 10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013:aid-cncr2820730802>3.0.co;2-j
192. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997. 326 (Pt 1):1–16. doi: 10.1042/bj3260001
193. Nano M, Mondo JA, Harwood J, Balasanyan V, Montell DJ. Cell survival following direct executioner-caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023. 120(4):e2216531120. doi: 10.1073/pnas.2216531120
194. Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res*. 1999. 250(1):203–12. doi: 10.1006/excr.1999.4501.
195. Zhu L, Huang X, Choi KY, Ma Y, Zhang F, Liu G, Lee S, Chen X. Real-time monitoring of caspase cascade activation in living cells. *J Control Release*. 2012. 163(1):55–62. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.044
196. Li J, Wang J-L, Gan C-Y, Cai X-F, Wang Y-W, Long Q-X, Sun Y-X, Wei X-F, Cui J, Huang A-L, Hu J-L. Caspase sensors based on NanoLuc. *J Biotechnol*. 2022. 357:100–7. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.08.005
197. Townson D, Combelles C. Ovarian Follicular Atresia. In: Darwish A, editor. *Basic Gynecology - Some Related Issues*. InTech. 2012. doi: 10.5772/32465
198. Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW, Kim HR. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res*. 2000. 42(4):373–81. doi: 10.1006/phrs.2000.0700
199. Jia X, Zheng Y, Guo Y, Chen K. Sodium butyrate and panobinostat induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via multiple pathways. *Mol Genet Genomic Med*. 2019. 7(5):e613. doi: 10.1002/mgg3.613
200. Mester-Pavel P-I. Wirkmechanismen von targeted therapies und die Entwicklung neuer Kombinationstherapien zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms [Dissertation]. Regensburg. Universität Regensburg. 2022. Verfügbar unter: <https://epub.uni-regensburg.de/52925/1/Disertation%20Mester.pdf>
201. Krammer PH, Kamiński M, Kiessling M, Gülow K. No life without death. *Adv Cancer Res*. 2007. 97:111–38. doi: 10.1016/S0065-230X(06)97005-5
202. Lin C-Y, Wu H-Y, Wang P-L, Yuan C-J. Mammalian Ste20-like protein kinase 3 induces a caspase-independent apoptotic pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010. 42(1):98–105. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.012
203. Sarrion-Perdigones A, Gonzalez Y, Chang L, Gallego-Flores T, Young DW, Venken KJT. Multiplex Hextuple Luciferase Assaying. *Methods Mol Biol*. 2022. 2524:433–56. doi: 10.1007/978-1-0716-2453-1_33
204. Viviani VR, Pelentir GF, Bevilaqua VR. Bioluminescence Color-Tuning Firefly Luciferases: Engineering and Prospects for Real-Time Intracellular pH Imaging and Heavy Metal Biosensing. *Biosensors (Basel)*. 2022. 12(6). doi: 10.3390/bios12060400
205. Anderson JC, Grounds H, Jathoul AP, Murray JAH, Pacman SJ, Tisi L. Convergent synthesis and optical properties of near-infrared emitting bioluminescent infra-luciferins. *RSC Adv*. 2017. 7(7):3975–82. doi: 10.1039/C6RA19541E

206. Bakhsheshian J, Wei B-R, Chang K-E, Shukla S, Ambudkar SV, Simpson RM, Gottesman MM, Hall MD. Bioluminescent imaging of drug efflux at the blood-brain barrier mediated by the transporter ABCG2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. 110(51):20801–6. doi: 10.1073/pnas.1312159110
207. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol*. 2011. 1227. doi: 10.1186/1471-2199-12-27
208. Ramsay G, Evan GI, Bishop JM. The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. 81(24):7742–6. doi: 10.1073/pnas.81.24.7742
209. Illumina. NextSeq™ 550 System - Specification Sheet: Tunable sequencing output and array scanning on a single instrument. 2025 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-550-system-spec-sheet-m-gl-01298/nextseq-550-system-spec-sheet-m-gl-01298.pdf>
210. Ortega-Recalde O, Peat JR, Bond DM, Hore TA. Estimating Global Methylation and Erasure Using Low-Coverage Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS). *Methods Mol Biol*. 2021. 227229–44. doi: 10.1007/978-1-0716-1294-1_3
211. Hornschuh M, Wirthgen E, Wolfien M, Singh KP, Wolkenhauer O, Däbritz J. The role of epigenetic modifications for the pathogenesis of Crohn's disease. *Clin Epigenetics*. 2021. 13(1):108. doi: 10.1186/s13148-021-01089-3
212. Meng W, Fenton CG, Johnsen K-M, Taman H, Florholmen J, Paulssen RH. DNA methylation fine-tunes pro-and anti-inflammatory signalling pathways in inactive ulcerative colitis tissue biopsies. *Sci Rep*. 2024. 14(1):6789. doi: 10.1038/s41598-024-57440-0
213. Kim Y-H, Lee HC, Kim S-Y, Yeom YI, Ryu KJ, Min B-H, Kim D-H, Son HJ, Rhee P-L, Kim JJ, Rhee JC, Kim HC, Chun H-K, Grady WM, Kim YS. Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations. *Ann Surg Oncol*. 2011. 18(8):2338–47. doi: 10.1245/s10434-011-1573-y
214. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013. 2(9):e71. doi: 10.1038/oncsis.2013.35
215. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013. 31(9):822–6. doi: 10.1038/nbt.2623
216. Zaidi SH, Harrison TA, Phipps AI, Steinfeld R, Trinh QM, Qu C, Banbury BL, Georgeson P, Grasso CS, Giannakis M, Adams JB, Alwers E, Amitay EL, Barfield RT, Berndt SI, Borozan I, Brenner H, Brezina S, Buchanan DD, Cao Y, Chan AT, Chang-Claude J, Connolly CM, Drew DA, Farris AB, Figueiredo JC, French AJ, Fuchs CS, Garraway LA, Gruber S, Ginter MA, Hamilton SR, Harlid S, Heisler LE, Hidaka A, Hopper JL, Huang W-Y, Huyghe JR, Jenkins MA, Krzyzanowski PM, Lemire M, Lin Y, Luo X, Mardis ER, McPherson JD, Miller JK, Moreno V, Mu XJ, Nishihara R, Papadopoulos N, Pasternack D, Quist MJ, Rafikova A, Reid EEG, Shinbrot E, Shirts BH, Stein LD, Teney CD, Timms L, Um CY, van Guelpen B, van Tassel M, Wang X, Wheeler DA, Yung CK, Hsu L, Ogino S, Gsur A, Newcomb PA, Gallinger S, Hoffmeister M, Campbell PT, Thibodeau SN, Sun W, Hudson TJ, Peters U. Landscape of somatic single nucleotide variants and indels in colorectal cancer and impact on survival. *Nat Commun*. 2020. 11(1):3644. doi: 10.1038/s41467-020-17386-z

217. Miles B, Tadi P. StatPearls: Genetics, Somatic Mutation. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL). 2025 [Zuletzt abgerufen am 10.07.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557896/>
218. Juul RI, Nielsen MM, Juul M, Feuerbach L, Pedersen JS. The landscape and driver potential of site-specific hotspots across cancer genomes. *NPJ Genom Med*. 2021. 6(1):33. doi: 10.1038/s41525-021-00197-6
219. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005. 6(8):597–610. doi: 10.1038/nrg1655
220. Bakulski KM, Fallin MD. Epigenetic epidemiology: promises for public health research. *Environ Mol Mutagen*. 2014. 55(3):171–83. doi: 10.1002/em.21850
221. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002. 21(35):5400–13. doi: 10.1038/sj.onc.1205651
222. Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, Lutsenko GV, Leonova OG, Popenko VI, Sapozhnikov AM, Deyev SM. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*. 2008. 3(6):e2434. doi: 10.1371/journal.pone.0002434
223. Free K, Nakanishi H, Itaka K. Development of Synthetic mRNAs Encoding Split Cytotoxic Proteins for Selective Cell Elimination Based on Specific Protein Detection. *Pharmaceutics*. 2023. 15(1). doi: 10.3390/pharmaceutics15010213
224. Zukher I, Dujardin G, Sousa-Luís R, Proudfoot NJ. Elongation roadblocks mediated by dCas9 across human genes modulate transcription and nascent RNA processing. *Nat Struct Mol Biol*. 2023. 30(10):1536–48. doi: 10.1038/s41594-023-01090-9
225. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*. 2021. 6(1):53. doi: 10.1038/s41392-021-00487-6
226. Sparmann A, Vogel J. RNA-based medicine: from molecular mechanisms to therapy. *EMBO J*. 2023. 42(21):e114760. doi: 10.15252/embj.2023114760
227. Samelson-Jones BJ, Small JC, George LA. Roctavian gene therapy for hemophilia A. *Blood Adv*. 2024. 8(19):5179–89. doi: 10.1182/bloodadvances.2023011847

8 Anhang



Anhang 1: Plasmidkarten des Methylierungsreportersystems & Triple Caspase Assays. (A) Das ursprüngliche MBD-Konstrukt enthält neben der Methyl-Binding-Domain, auf welche Cage-Latch, das C-Intein gp41-1 und TEVp3-70aa folgt, auch die flipNluc sowie die jeweilige sgRNA der untersuchten Gene (hier exemplarisch das Methylierungspanel SCTR & EN1 dargestellt). (B) Die sterisch optimierte Variante des MBD-Konstrukts enthält eine veränderte Bindestelle des Inteins bzw. Linkers an TEVp3-70aa. (C) Das dCas9-Konstrukt besitzt TEVp61-242, welche über das N-Intein gp41-1 und dem Key mit der deadCas9 verbunden ist. Verglichen mit der ursprünglichen Variante ist an der splitTEV-Protease ein SV40-NLS ergänzt. (D) Das Konstrukt empty guide wird als Kontrolle eingesetzt, wobei keine Zielsequenzen der sgRNA vorhanden sind und somit keine zielgerichtete dCas9-Bindung erfolgen kann. (E) Das Plasmid für die lentivirale Integration des Triple Caspase Assays kodiert die drei Caspasen-Reportersysteme flipNluc (Casp8), CPFluc (Casp9) sowie flip-mNG3A (Casp3). Die jeweiligen funktionellen Domänen des Reportersystems sind in hellgrau dargestellt.

Anhang 2: sgRNA-Zielsequenz der differenziell methylierten Regionen. Jeweils sechs Zielsequenzen (durch verschiedene Farbgebung gekennzeichnet) werden in Form eines Biomarkerpanels und somit durch ein Plasmid untersucht. Dieses Plasmid enthält neben der sgRNA auch das MBD-Konstrukt sowie die flipNluc, welche durch die TEV-Protease induziert werden kann.

EN1_1	TCCGAGTTCGTGCGGCTCAA
EN1_2	GTAAACGTGCGACGCTAGCT
EN1_3	GAGCCCGACGTGTCAATAAC
SCTR_1	CTCTTTCCGGACCCGGGGTT
SCTR_2	AAGCCGCGTCCTGATCAATG
SCTR_3	CGCAGTACTCACCGAGTGCG
IKZF1_1	ACGTGAAGCTGAGCGTACAG
IKZF1_2	CACTCTAACAAGTGACTGCG
MNX1_1	TAACCTCCGAGCACACGACC
MNX1_2	GCCGGGCGTGCAAACGCATG
VWC2_1	TGTTAGTGGTCCGCCCCACG
VWC2_2	GTTCCGGGCCAATCGCGTCC
DLX4_1	GCACCCGGCGATGAAGACGT
DLX4_2	GCGCCCGAGGCCACGGGTGA
NKX1-1_1	CTGTACATAACCGGTTGCTA
NKX1-1_2	GCATTTAATAACAGGCCCGG
GATA5_1	ACAGGTAGGACAGCATCGAG
GATA5_2	AAGACGGGCTCCGTGTCTGG
FOXC2_1	GCAAACCTTTCCCAACGTGC
FOXC2_2	GCCAAGTCCCTTTTAGGGAT
LONRF2_1	CTGCTGGGCCGGACAGGTGT
LONRF2_1	CATCGCAAGAGACGCGGACC
PCDH7_1	TGAGGATGCGGACCGCGGGA
PCDH7_2	CGGGCTTCTCTTTGGCGCGC
RASAL3_1	GTTGTCCTGCAGATGGGAGT
RASAL3_2	GTGGGACTGAGGTGGAATCG
TP73_1	GCCGTTGGGAGGGTAACCCC
TP73_2	GCACCGGGCGAAGAATCGTG
SIX1_1	GTGTTTCGAGTTTAGGCGGCC
SIX1_2	ATACTTCTGGCGAGTAGCGG
SDC2_1	CAATCGGCGTGTAATCCTGT
TFPI2_1	TTCTGTCCCCTTCCGAGCGG
PCDH8_1	TTCGCGGTCCAGCGACGCCG

PCDH8_2	TCGGGTGATTAGCATATCGG
SALL3_1	GCGGCCGCTAATTGCGAGCG
SALL3_2	AAAAAGACGTAAGTGGGGCGA
EN2_1	ATTTAACCCCTCCTTCCGG
EN2_2	GCCTGAGTTGGAAGATCGTA
MSX1_1	CTCCGGAGGTTTGCCCGAGA
MAX1_2	TCTGTCGCCGTGTCCACGGA
PDX1_1	GTACATCTCACGGCCGCGCC
ALX3_1	CCTGTGAGCGCCCGCCAAGG
GAD2_1	GTGGCTCAGAAAGTTCACGGG
GAD2_2	AGGCGTGCCAGCGCGTCTC
IFR4_1	CGAACCTCTGGTTCGCGCTC
IRF4_2	GCAAGACGAGCGGCGCGTGT
SOX1_1	TCGACAATAGACTTCCCGC
SOX1_2	ATGTACTTGCCCGCCGGCGA

Anhang 3: Auflistung der verwendeten (ChIP)-qPCR-Primer.

GPI_1_fw	TCCTTCCTCCTCGGCTC
GPI_1_rv	GGTACCATTGCTGCAGC
GPI_2_fw	AGGCCGAGTCCGCAC
GPI_2_rv	AGGAGGAGGGGAAATGTCC
GPI_3_fw	GTTTGAGGGAGCTGGGTG
GPI_3_rv	CGCCCATGATTTGCTCAAAC
EN1_2_fw	AGGCGAGTCAATCAAAGCAG
EN1_2_rv	TTCCTCTGGCTGGTCTCTC
EN1_3_fw	TGGTTACTTTTCAAGGCGC
EN1_3_rv	CCACAAAGGGAAAGCAATGC
EN1_7_fw	CCAGGGAAAGGGGACAGTAC
EN1_7_rv	ACGCTTGGAGCCCAGAG
SCTR_1_fw	CTTCTACGCGGCAATCCC
SCTR_1_rv	ACAAAGGTGACCTAAGTTGCC
SCTR_2_fw	TGAGCCACCCGACCTG
SCTR_2_rv	AGTCCCTGCCGGGTG
SCTR_3_fw	TAGTCCCTCTCCACCTGC
SCTR_3_rv	AGCTACTACTGCCGGTG
GAPDH_1_fw	TGCCAGCCTAGCGTTG
GAPDH_1_rv	TGGGAGATCTGGTTTCCG
GAPDH_2_fw	GCTCACTGTTCTCTCCCTC
GAPDH_2_rv	AAGGCTCGTAGACGCG
GAPDH_3_fw	AGTCAGGTGGAGCGAGG
GAPDH_3_rv	AGGGGACACAAGAGGACC

9 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Mathias Seubert, geboren am 04.04.2000 in Halle (Saale), dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die Anregung zur Durchführung dieser Dissertation sowie die fachliche Überwachung der Ausarbeitung erfolgte durch Herrn PD Dr. Karsten Gülow.

Ort, Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Allen voran möchte ich **Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA** meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Sie ermöglichte mir die Arbeit in ihrem Labor zusammen mit einem äußerst kompetenten und professionellen Team. Durch die geförderte regelmäßige Teilnahme an Forschungsseminaren und weiteren klinikinternen Veranstaltungen hat sie maßgeblich zu meiner wissenschaftlichen Weiterentwicklung beigetragen und mir wertvolle interdisziplinäre Ausblicke „über den Tellerrand hinaus“ gewährt. Die Gelegenheit, mein Projekt vor dem Team der **Klinik für Innere Medizin I** vorzustellen, brachte wertvolle und konstruktive Ansätze für die Fortführung dieser Arbeit. Darüber hinaus bin ich Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA sehr dankbar für die Ermutigung, Teile meiner Arbeit für wissenschaftliche Kongresse aufzubereiten. Ihre Expertise in der Erstellung von Abstracts und Präsentationen war dabei stets von großem Nutzen.

Außerordentlicher Dank gebührt auch dem Betreuer dieser Arbeit, **Herrn PD Dr. Karsten Gülow**, für die Vergabe des spannenden und praxisrelevanten Themas sowie für die wertvolle Unterstützung bei der Planung des Projekts und der Experimente. Seine konstruktiven Korrekturen dieser Arbeit, der Abstracts und die stets unkomplizierte Kontaktaufnahme waren von unschätzbarem Wert. Seine Bürotür stand jederzeit offen – und das nicht nur im übertragenen Sinne. Auch **Frau Prof. Dr. Claudia Kunst** danke ich herzlich für ihre überaus wertvollen Themenvorschläge während regelmäßiger Treffen der Arbeitsgruppe und ihr offenes Ohr bei auftretenden Herausforderungen.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. Deniz Tümen** für die unmittelbare Betreuung im Labor, die überaus geduldige Einführung in die verschiedenen Labormethoden und die großartige Hilfe beim Troubleshooting. Ohne deine Projektideen, deine gentechnische Expertise und deine motivierende Art wäre diese Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht möglich gewesen.

Für die äußerst angenehme Atmosphäre im Laboralltag möchte ich mich zudem bei allen weiteren Teammitgliedern, Doktoranden, Studierenden und Praktikanten bedanken. Vielen Dank insbesondere für eure riesige Unterstützung, nicht nur im Labor, liebe **Heidi Gschwendtner, Kirstin Pollinger, Lisa Aschenbrenner, Manuela Peisl-Gunckel** und **Martina Meisinger**. Zusammen seid ihr die gute Seele des Labors!

Für die unkomplizierte Durchführung des *Next Generation Sequencing* sowie die Nutzung des Covaris möchte ich mich recht herzlich bei der **Klinik für Innere Medizin III** bedanken.

11 Lebenslauf

