Aus der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer

Einfluss von Azathioprin und Azacitidin auf den Methylierungsstatus und die transkriptionelle Aktivität humaner endogener Retroviren im kolorektalen Karzinom

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Lorenz Konstantin Weber
geb. am 13.10.1994 in Hagenow
aus Rostock

Rostock, April 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003161

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher
Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med Carl Friedrich Classen
Kinder- und Jugendklinik
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. med. Dr. rer. nat. Lena-Christin Conradi
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
Universitätsmedizin Göttingen

Jahr der Einreichung: 2020
Jahr der Verteidigung: 2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Das kolorektale Karzinom 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Risikofaktoren 2
1.1.3 Pathogenese 3
1.2 Exogene Retroviren in der Tumorgenese 6
1.3 Humane endogene Retroviren 7
1.3.1 Grundlagen 7
1.3.2 HERV in der allgemeinen Tumorgenese 9
1.3.3 HERV-H im Bezug zum KRK 11
1.4 DNA-Methylierung 12
1.4.1 Einführung 12
1.4.2 Veränderungen in der Tumorgenese 13
1.4.3 Medikamentöse Beeinflussung 14
1.4.3.1 Azathioprin 14
1.4.3.2 Azacitidin 15
1.5 Zielstellung der Arbeit 16

2 Material und Methoden 17
2.1 Materialien 17
2.1.1 Laborgeräte 17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 18
2.1.3 Chemikalien 19
2.1.4 Antikörper 21
2.1.5 Medien und Lösungen 21
2.1.6 Zelllinien 22
2.1.7 Software 23
2.1.8 Formatierung 23
2.2 Methoden 24
2.2.1 Zellkultur 24
2.2.1.1 Grundlagen 24
2.2.1.2 Passagieren der Zellen und Zellzahlbestimmung 24
2.2.1.3 Kryokonservierung 25
2.2.1.4 Kristallviolettassay 25
2.2.2 Molekularbiologische Verfahren 26
2.2.2.1 RNA-Isolation 26
2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung 26
2.2.2.3 cDNA-Synthese 26
2.2.2.4 Quantitative Real-Time PCR 27
2.2.2.5 Gelelektrophorese 29
2.2.3 Medikamentenbehandlungen 29
2.2.3.1 IC_{50}-Bestimmung 29

2.2.3.2 Finaler Ansatz 30
2.2.4 Durchflusszytometrie 31
2.2.4.1 Grundlagen 31
2.2.4.2 Intrazelluläre Färbung 31
2.2.4.3 Extrazelluläre Färbung 32
2.2.4.4 Messung und Auswertung 33
2.2.5 Statistik 33

3 Ergebnisse 34
3.1 Wachstumsverhalten der Zelllinien 34
3.2 Basale HERV-H Expression 36
3.2.1 Untersuchung auf RNA-Ebene 36
3.2.1.1 Screening 36
3.2.1.2 Klassifikation der Zelllinien 37
3.2.2 Analyse der Proteinexpression 39
3.2.3 Expressionsvergleich RNA vs. Protein 44
3.3 IC_{50}-Bestimmung 45
3.3.1 Allgemeine Durchführung 45
3.3.2 Azathioprin 45
3.3.3 Azacitidin 48
3.4 Finale Behandlungen 51
3.4.1 Grundlagen 51
3.4.2 Azathioprin 52
3.4.2.1 Niedrige Expressionsgruppe 52
3.4.2.2 Mittlere Expressionsgruppe 53
3.4.2.3 Hohe Expressionsgruppe 53
3.4.2.4 Zusammenfassung Azathioprintherapie 55
3.4.3 Azacitidin 56
3.4.3.1 Vitalitätsanalysen 56
3.4.3.2 Niedrige Expressionsgruppe 58
3.4.3.3 Mittlere Expressionsgruppe 60
3.4.3.4 Hohe Expressionsgruppe 62
3.4.3.5 Zusammenfassung Azacitidintherapie 63
3.5 Immunoscreen 65

4 Diskussion 66
4.1 Behandlung des kolorektalen Karzinoms 66
4.1.1 Aktuelle Herausforderungen der Therapie 66
4.1.2 Immuntherapie 66
4.1.2.1 Grundlagen Tumorimmunologie 66
4.1.2.2 Aktuelle Immuntherapie beim KRK 69
4.2 Verbesserungsmöglichkeiten der Methodik 71
4.3 Screening der basalen HERV-Expression 73
4.4 Medikamentöse HERV-Induktion 76
4.4.1 Azathioprin 76
4.4.2 Azacitidin 77

4.4.3 Valproinsäure 79
4.5 HERV in Tumordiagnostik und -therapie 80
4.5.1 Ein neuer Biomarker maligner Neoplasien? 80
4.5.2 HERV als Neoantigene für CTL-Antworten? 81
4.5.3 Ausblick und aktuelle Literatur 82

5 Zusammenfassung 83

6 Thesen 84

A Anhang 86
A.1 Material & Methoden 86
A.2 Ergebnisse 87
A.2.1 HERV-H Screening 87
A.2.2 Finale Azathioprinbehandlung 90
A.2.3 Finale Azacitidinbehandlung 93

Abkürzungsverzeichnis 96

Abbildungsverzeichnis 101

Tabellenverzeichnis 105

Literaturverzeichnis 106

Selbstständigkeitserklärung 123

Danksagung 124

Lebenslauf 125

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

2018 sind weltweit schätzungsweise 18,1 Millionen Menschen neu an einer bösartigen Neoplasie erkrankt (Bray et al., 2018), wobei das kolorektale Karzinom (KRK) als dritthäufigste Krebserkrankung für jeden vierten Todesfall als Folge eines Tumorleidens verantwortlich ist (Mármol et al., 2017). Das KRK ist weiterhin primär eine Erkrankung der westlichen Welt, deren Bewohner ein Lebenszeitrisiko von ca. 5 % besitzen an diesem Tumorleiden zu erkranken (Torre et al., 2015). Die altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate des KRK in Deutschland liegt unterhalb des EU-Durchschnitts und spiegelt so den seit 2004 beobachteten Inzidenzrückgang wider. Diese Entwicklung wird vom Robert Koch-Institut mit der Einführung der Koloskopie 2002 als Screening für alle Versicherten ab dem 55. Lebensjahr in Verbindung gebracht. Es lässt sich auch bei der altersstandardisierten Sterberate seit den 1990er Jahren ein Rückgang verzeichnen (siehe Abbildung 1.1). So hat sich dieser Wert zwischen 2003 und 2013 im Durchschnitt jährlich für Männer um 3,1 % bzw. für Frauen um 2,4 % reduziert. Trotz dieser positiven Entwicklung sind in Deutschland 2013 rund 25.700 Erkrankte am KRK verstorben. Gleichzeitig wurde bei 62.400 Menschen dieses Tumorleiden neu diagnostiziert, dabei bei Männern häufiger als bei Frauen. Da das Risiko am KRK zu erkranken mit zunehmendem Lebensalter stark ansteigt, ist das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland (70,3 Jahren bei Männern; 72,9 Jahren bei Frauen) sehr hoch (Barnes et al., 2016).

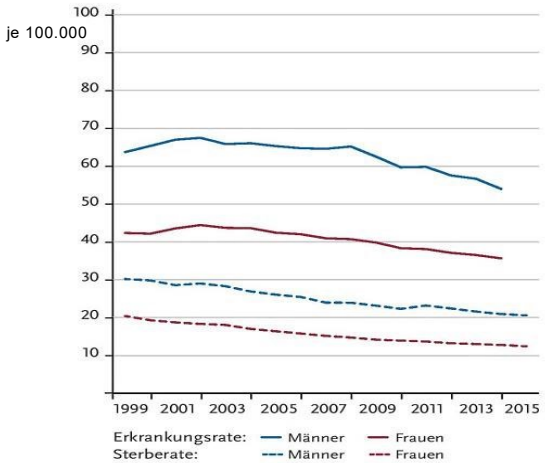

Abbildung 1.1: *Altersstandardisierte und nach Geschlecht sortierte Erkrankungs- und Sterberaten des KRK. DE 1999 – 2012 je 100.000 Einwohner (Barnes et al., 2016).*

1.1.2 Risikofaktoren

Die Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken wird maßgeblich durch den persönlichen Lebensstil mitbestimmt, wobei das Zigarettenrauchen den am besten belegten Risikofaktor darstellt. So hat die Gruppe von Øines und Kollegen zusammengefasst, dass das Risiko für die Polypenentstehung, die zum KRK führen kann, bei Rauchern um das zwei- bis dreifache erhöht ist (Øines et al., 2017). Dieser Zusammenhang zeigt sich noch insbesondere verstärkt bei der Entwicklung von Hochrisikoadenomen (Botteri et al., 2008). Außerdem ist dabei eine gesteigerte Anzahl an *pack-years* im Stile einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem hohen Risiko für die Erkrankung an einem KRK vergesellschaftet (Giovannucci, 2001; Shin et al., 2011). Demgegenüber stellt sich beim Alkoholkonsum der Zusammenhang zwischen der Exposition und der Entwicklung von Polypen und KRK in einer umfangreichen Metaanalyse deutlich schwächer dar (Bailie et al., 2017). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass Frauen, die mindestens 30 g Alkohol pro Tag konsumieren, ein rund 1,8-fach erhöhtes Risiko haben im distalen Kolon oder im Rektum einen hyperplastischen Polyp zu entwickeln (Mostofsky et al., 2016). Das durch Alkoholgenuss erhöhte Risiko für dieses Krebsleiden verstärkt sich noch einmal deutlich für Personen, bei denen eine familiäre Häufung des KRK vorliegt (Cho et al., 2012), oder die mehr als 45 g Alkohol pro Tag aufnehmen (Cho et al., 2004). Als weiterer Risikofaktor gilt Übergewicht, denn eine Erhöhung des Body-Mass-Index um fünf Einheiten steigert die Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken um 18 %. Dieser Zusammenhang ist für Männer deutlich stärker als für Frauen. Dabei ist das Kolon von dieser malignen Neubildung signifikant häufiger betroffen als das Rektum (Giovannucci und Michaud, 2007; Ning et al., 2010). Adipöse Patienten leiden vielfach unter einer Hyperinsulinämie, verbunden mit erhöhten Spiegeln an ungebundenem und aktivem *insulin-like growth factor* (IGF) 1, welcher maßgeblich im Verdacht steht über seine antiapoptotischen und wachstumsfördernden Effekte die Bildung eines KRK mitzuverursachen (Clayton et al., 2011). Ausreichende Bewegung und Sport können jedoch sehr spezifisch das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken um 24 % reduzieren (Wolin et al., 2009), wobei sich beim Rektumkarzinom keine Verringerung der Erkrankungswahrscheinlichkeit verzeichnen lässt (Friedenreich et al., 2006; Thune und Lund, 1996). Darüber hinaus haben Patienten mit mittlerer bis hoher körperlicher Aktivität eine mit 36 % besonders hohe Risikoreduktion für rechtsseitige Kolonkarzinome (Friedenreich et al., 2006).

1.1.3 Pathogenese

Das genetische Modell der kolorektalen Tumorgenese, das von der Gruppe um Fearon und Vogelstein in ihrer gleichnamigen Arbeit schon 1990 beschrieben wurde, bildet bis heute eine wichtige Basis für das Verständnis der Pathogenese des KRK. Hierbei begründet die Akkumulation von (Punkt-)Mutationen, sowie numerischen und strukturellen Chromosomenabweichungen die Entwicklung von epithelialen Dysplasien, Adenomen und schließlich eines KRK, was zur Zusammenfassung dieses Modells als Adenom-Karzinom-Sequenz geführt hat (Fearon und Vogelstein, 1990). Durch weitere molekulare Entdeckungen wird beim KRK heute zwischen chromosomaler Instabilität (CIN), dem CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP) oder einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) unterschieden (Ostwald et al., 2009).

Die Entstehung von CIN^+ Tumoren, die rund 70 – 85 % aller KRK ausmachen, wird auch als Suppressorweg bezeichnet und basiert größtenteils auf dem o.g. Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Worthley et al., 2007). Die initiale Mutation betrifft hierbei primär das adenomatöse Polyposis Coli (APC) Gen, welches eine entscheidende Rolle bei der Herabregulierung des *wingless int-1* (wnt-1) Signalwegs spielt. So wird die Inaktivierung von freiem β-Catenin im Zytoplasma mittels Phosphorylierung bei einem fehlerhaften APC-Protein verhindert, was zu einer durch β-Catenin vermittelten Hochregulierung potenziell tumorfördernder Gene wie Cyclin D1 im Nucleus führt (Alao, 2007; Polakis, 1997). Zudem kommt es bei einem Funktionsverlust des APC-Proteins zu einer fehlerhaften Ausbildung des Spindelapparats (Zumbrunn et al., 2001), die ebenfalls eine CIN mitverursachen kann. Die Mutation des APC-Gens erfolgt zwar überwiegend spontan, kann jedoch auch hereditär im Rahmen der familiären adenomatösen Polyposis auftreten. Dabei ist ein Allel des APC-Gens durch eine Keimbahnmutation verändert und das verbleibende durch eine zusätzliche Mutation oder einen Heterozygotieverlust inaktiviert (Leoz et al., 2015). Mutationen im Protoonkogen Kirsten ras (KRAS), das für ein gleichnamiges kleines G-Protein codiert, fördern unter anderem mittels antiapoptotischer Effekte die Adenomentwicklung, sodass sie sich mit zunehmender Adenomgröße häufen und schließlich bei 40 % aller KRK auftreten (Fearon, 2011). Dadurch werden sie nach dem Defekt des APC-Proteins als zweiter Schritt der Tumorgenese des KRK eingeordnet (siehe Abbildung 1.2). Da jedoch der dysplastische, aberrante Kryptenfokus als Vorstufe für die Karzinomentwicklung des Kolons gilt und die KRAS-Mutation dort mit 63 % außerordentlich häufig auftritt, wird mittlerweile die Einordnung dieser Mutation vor der APC-Inaktivierung diskutiert (Pretlow und Pretlow, 2005; Worthley et al., 2007). Darüber hinaus ist bei CIN^+ KRK ein Heterozygotieverlust des Chromosoms 18q gut beschrieben, wodurch unter

anderem die dort lokalisierten Gene *deleted in colorectal cancer* (DCC) und *small mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD) 2 und 4 betroffen sind. Obwohl bei etwa 60 % der KRK dieser Chromosomenverlust auftritt (Tarafa et al., 2000) sind Mutationen von SMAD2 mit rund 6 % sehr selten und ein verändertes SMAD4-Gen tritt mit 16 – 25 % etwas häufiger auf. Die von beiden Genen codierten gleichnamigen Proteine haben jedoch als Bestandteil des *transforming growth factor beta* (TGF-β) Signalwegs eine antiproliferative Wirkung, indem sie die Transkription von wichtigen Enzymen der Zellzyklusregulation wie *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (CDKN1B) vermitteln (Xu und Pasche, 2007). Das DCC-Protein hingegen ist ein Netrin-1 Rezeptor, der bei Abwesenheit des Ligands über den Caspase-9 Signalweg die Apoptose induziert und bei Funktionsverlust zur Tumorentstehung beitragen kann (Forcet et al., 2001). Eine Mutation des p53-Gens mit einem Heterozygotieverlust des zugehörigen Chromosoms 17p markiert bei der Tumorgenese des KRK den entscheidenden Übergang vom Adenom zum Karzinom (siehe Abbildung 1.2) (Iacopetta, 2003). Das Wildtyp p53-Protein wird dabei als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es im Zellzyklus die DNA auf mögliche Schäden untersucht, wenn nötig Reparaturmechanismen in Gang setzt und für diese Zeit den Zellzyklus stoppt (Efeyan und Serrano, 2007). Außerdem ist es bei schweren Schäden in der Lage über das Bcl-2 assoziierte X-Protein (Bax) die Apoptose zu induzieren (Li et al., 2015). Trotz der scheinbar linearen Abfolge der Adenom-Karzinom-Sequenz haben Fearon und Vogelstein schon in ihrer Originalarbeit festgestellt, dass die Reihenfolge der genetischen Veränderungen nicht von entscheidender Bedeutung für die Tumorprogression ist und im finalen KRK häufig nur ein Teil der beschriebenen Abweichungen vorliegt (Fearon und Vogelstein, 1990).

Als zweite wichtige Ursache für genetisch instabile KRK gilt das Vorhandensein einer MSI. Die darüber definierte Tumorklasse liegt jedoch nur bei rund 15 % der KRK vor und ist somit deutlich seltener als die der CIN^+ KRK (Boland und Goel, 2010). Als Mikrosatelliten werden kurze DNA-Abschnitte aus sich wiederholenden Nukleotiden, wie beispielweise dem Dinukleotid Cytosin/Adenosin, bezeichnet. Durch ihren repetitiven Charakter sind diese Bereiche jedoch besonders anfällig für numerische Replikationsfehler. Das Fortbestehen dieser Längenpolymorphismen mit der möglichen klonalen Expansion der betroffenen Zellen wird durch einen Ausfall des DNA-Mismatch-Reparatursystems (MMR) ermöglicht. Auch für die kolorektale Karzinogenese relevante Gene, die über entsprechende repetitive Elemente verfügen, werden durch diese Mutationen beeinflusst (Söreide et al., 2006). Infolgedessen ist der antiproliferative TGF-β Signalweg durch Ausbildung eines fehlerhaften TGF-β2 Rezeptors häufig beeinträchtigt (Akiyama et al., 1996; Markowitz

et al., 1995). Auch treten, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, Mutationen bei sowohl wachstumsregulierenden (Aktivin Rezeptor-2 (Jung et al., 2004), IGF-2 Rezeptor (Souza et al., 1996), Axin-2 (Duval und Hamelin, 2002)), als auch proapoptotischen und zellzyklusregulierenden Genen wie Bax und Caspase-5 auf (Trojan et al., 2004). Der größte Teil der KRK mit hoher MSI (MSI-H) entwickelt sich sporadisch und ist durch einen MMR-Funktionsverlust aufgrund eines epigenetisch ausgeschalteten MutL Escherichia Coli homolog 1 (MLH1) Gens gekennzeichnet (Duval und Hamelin, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus (siehe Kapitel 1.4) beruht auf Inseln hypermethylierter Cytosin/Guanin (CpG) Dinukleotide (Lao und Grady, 2011). Dadurch kommt es häufig zu einer Überschneidung zwischen $CIMP^+$ und MSI-H. Dabei ist diese Kombination oft mit einer Mutation des Protoonkogens BRAF assoziiert, das den Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und damit das Zellwachstum beeinflussen kann (Barras, 2015; Jass, 2007). Sind bei $CIMP^+$ KRK jedoch keine MMR-Gene betroffen, werden diese dem alleinigen Methylator-Phänotyp zugeordnet (Worthley et al., 2007). Demgegenüber zeigt nur ein geringer Prozentsatz der MSI-H KRK eine hereditäre Genmutation des MMR, die dabei insbesondere MutS homolog 2 (MSH2) und MLH1 betrifft. Dieses als Lynch-Syndrom bzw. hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom (HNPCC) bezeichnete Leiden spielt zwar nur bei ca. 3 % der KRK eine Rolle, gilt aber als das häufigste zum KRK prädisponierende Syndrom (Lynch et al., 2009).

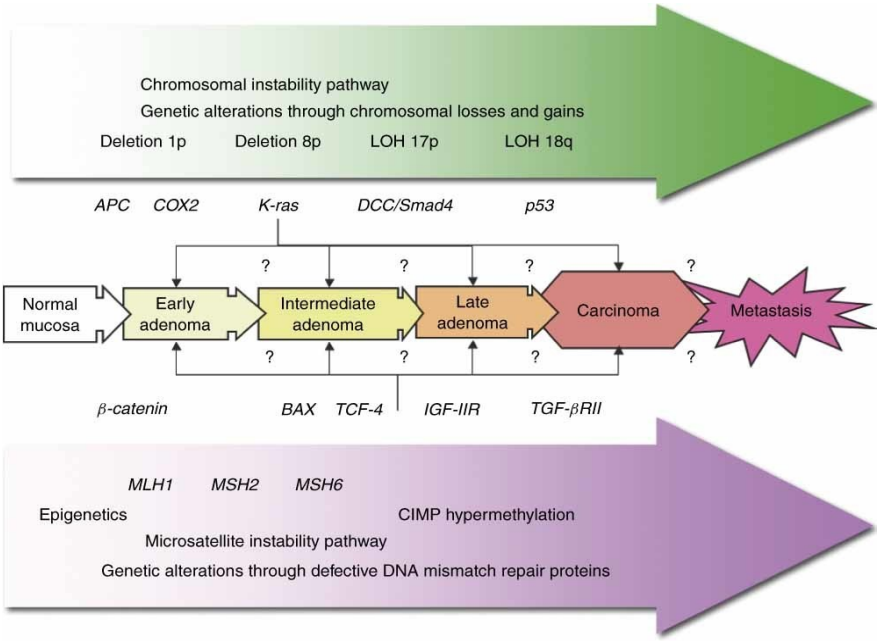

Abbildung 1.2: *Charakterisierung der molekularen Hauptentstehungsmechanismen des KRK. APC = Adenomatöse Polyposis Coli; BAX = Bcl-2 assoziiertes X-Protein; CIMP = CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp; COX2 = Cyclooxygenase-2; DCC = Deleted in colorectal cancer; IGF-IIR = Insulin-like growth factor 2 receptor; LOH = Loss of heterozygosity (Heterozygotie-verlust); MLH1 = MutL Escherichia Coli homolog 1; MSH2/MSH6 = MutS homolg 2/6; TCF-4 = T-Zell Faktor 4; TGF-βRII = Transforming growth factor β receptor 2 (Söreide et al., 2006).*

1.2 Exogene Retroviren in der Tumorgenese

Grundsätzlich wird die Tumorentstehung neben hereditären Faktoren vor allem durch Umwelteinflüsse begünstigt. Dabei ist das tumorerregende Potenzial nicht nur für radioaktive Strahlung und chemische Karzinogene, sondern insbesondere auch für Retroviren belegt (Ruprecht et al., 2008). Schon 1911 wurde der Begriff der Tumorvirologie mit der Entdeckung des in Hühnern vorkommenden Rous-Sarkom-Virus erstmals eingeführt (Smith und Smith, 2016). Dieses Virus besitzt das Onkogen der viralen Sarkom-Tyrosinkinase (v-src), das auf dem bei der viralen Replikation aufgenommenen Protoonkogen der zellulären Sarkom-Tyrosinkinase (c-src) basiert und eine Wachstumsförderung induziert (Rosenberg, 2010). Mittlerweile sind über n = 30 verschiedene retrovirale Onkogene bekannt, deren Übertragungen zwar ausschließlich in der Tierwelt, vorwiegend bei Nagetieren und Vögeln, eine Rolle spielen, jedoch in diesem Zusammenhang erstmals näher beschrieben werden konnten und dadurch die Grundlage für das spätere Verständnis der humanen Tumorgenese lieferten (Vogt, 2012). So löst das MC-29 Retrovirus mit dem enthaltenen viralen Myelocytomatosis (v-myc) Gen zum einen in Hühnern die Myelocytomatose aus (Alitalo et al., 1983). Auf der anderen Seite spielt aber dieses Gen als zelluläre Myelocytomatosis (c-myc) in einem translozierten Zustand eine wichtige Rolle bei der Entstehung des humanen Burkitt-Lymphoms (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982). Erst 1980 wurde mit der Entdeckung des humanen T-Zell-Leukämie-Virus 1 (HTLV-1) das erste und bis heute einzige exogene Retrovirus beschrieben, das eindeutig beim Menschen eine maligne Erkrankung auslösen kann (Javier und Butel, 2008). So sind weltweit 10 - 20 Millionen Menschen mit diesem Virus, das ähnlich wie HIV perinatal, sexuell, oder parenteral übertragen werden kann, infiziert (Edlich et al., 2000). Dabei entwickeln 2 – 6 % der Betroffenen im Laufe ihres Lebens eine T-Zell-Leukämie oder ein Lymphom (Taylor, 2015), welche durch eine schlechte Prognose mit hoher Chemotherapieresistenz gekennzeichnet sind (Matutes, 2007). Das Genom des HTLV-1 codiert für das Tax-Onkoprotein, das zellulär sowohl eine Apoptose hemmende (Okamoto et al., 2006), als auch wachstumssteigernde Wirkung besitzt. So bindet Tax an die Phosphatidylinositol-3-Kinase, die dann über eine verstärkte Phophorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt und der damit verbundenen Aktivierungen von Transkriptionsfaktoren die Proliferation der infizierten Zellen steigert (Matsuoka und Jeang, 2007).

1.3 Humane endogene Retroviren

1.3.1 Grundlagen

Rund 8 % des menschlichen Genoms (Lander et al., 2001) besteht aus endogenen Retroviren (ERV), die nach primären Entdeckungen in der Tierwelt erstmals in den 1980er Jahren beim Menschen sicher nachgewiesen wurden (Callahan et al., 1982; Martin et al., 1981). Diese humanen endogenen Retroviren (HERV) gehen meist auf Keimbahninfektionen mit infektiösen exogenen Retroviren vor vielen Millionen Jahren zurück und persistieren bis heute im menschlichen Genom (Dudley et al., 2010).

Der charakteristische Aufbau besteht aus zwei regulatorischen *long terminal repeat* (LTR) Abschnitten, sowohl am 3´-, als auch am 5´-Ende, welche die für Retroviren typischen Gene gag, pol und env umschließen. Als Bestandteil eines Proviruses codierten diese ursprünglich für Matrix- und Kapsidproteine bzw. gruppenspezifische Antigene (gag), replikationsrelevante Enzyme, wie Integrase oder reverse Transkriptase als RNA-abhängige DNA-Polymerase (pol), sowie für Hüllproteine (env) (Cohen und Larsson, 1988). Zur Initiierung der reversen Transkription des Virusgenoms, also dem Umschreiben der viralen Erbinformation von RNA zu DNA, ist eine zur Primer-Bindungsstelle (PBS) (siehe Abbildung 1.3-a) komplementäre transfer-RNA (tRNA) nötig (Marquet et al., 1995). Es gibt viele verschiedene Einteilungskriterien der HERV, jedoch ist die Differenzierung auf Basis des Einbuchstabencodes, der zur virusspezifischen tRNA gehörenden Aminosäure, die häufigste Klassifikation (Mullins und Linnebacher, 2012a). Da auch in dieser Arbeit dieses System verwendet wird, ist z.B. Histidin die Aminosäure, die mit der für HERV-H spezifischen tRNA korrespondiert (Lee et al., 2000).

Im Laufe der Evolution vervielfältigten sich die HERV-Strukturen durch Retrotransposition im menschlichen Genom, wurden dabei jedoch gleichzeitig durch Punktmutationen (schwarze Banden in Abbildung 1.3-b), Rasterverschiebungen und Deletionen größtenteils inaktiviert (Griffiths, 2001). Zusätzlich werden die HERV insbesondere durch DNA-Methylierung (siehe Kapitel 1.4) und Histon-Acetylierung epigenetisch supprimiert (Hurst und Magiorkinis, 2017). Durch homologe Rekombination beider LTR-Elemente ist es sogar häufig zum Verlust des gesamten zentralen Abschnitts gekommen (Prak und Kazazian, 2000), sodass heute diese sog. Solo-LTR (Abbildung 1.3-b) mindestens zehnmal häufiger sind als HERV mit kompletter proviraler Struktur (Stoye, 2001). Bedingt durch diese vielen Aberrationen ist eine Transposition der HERV im Allgemeinen nicht mehr möglich (Katoh und Kurata, 2013), sodass bis heute, anders als z.B. bei ERV in Mäusen (Ribet et al.,

2008), kein infektiöser Vertreter beschrieben wurde (Stoye, 2001). Trotzdem sind bei malignen Entartungen oder Autoimmunerkrankungen häufig für HERV spezifische Gene auf RNA-Ebene verstärkt exprimiert, die zur Produktion retroviraler Proteine führen können. Diese sind zwar meist unvollständig, führen jedoch teilweise in dem betroffenen Organismus zu einer Immunantwort (Nelson et al., 2003; Tugnet et al., 2013).

Als transponierende Elemente stellen HERV ebenso einen bedeutenden Faktor der Plastizität bzw. evolutionären Entwicklung des menschlichen Genoms dar (Nelson et al., 2003). Neben ihrer Promotorfunktion für bereits bestehende Gene bilden sie auch den Ursprung für Proteine, die heute essenzielle physiologische Funktionen übernehmen. Prominente Beispiele sind Syncytin-1 und -2, die auf der env-Sequenz der HERV-W bzw. HERV-FRD Familie basieren. Ähnlich zu der proviralen Fusionsfunktion von env sind sie u.a. an der Zytotrophoblastenverschmelzung bzw. Plazentakonstitution mit Aufbau der immunologischen Toleranz beteiligt (Blaise et al., 2003; Mallet et al., 2004). Darüber hinaus erhärten sich die Hinweise, dass HERV mit der Ausbildung pluripotenter Eigenschaften in Stammzellen assoziiert sind (Santoni et al., 2012).

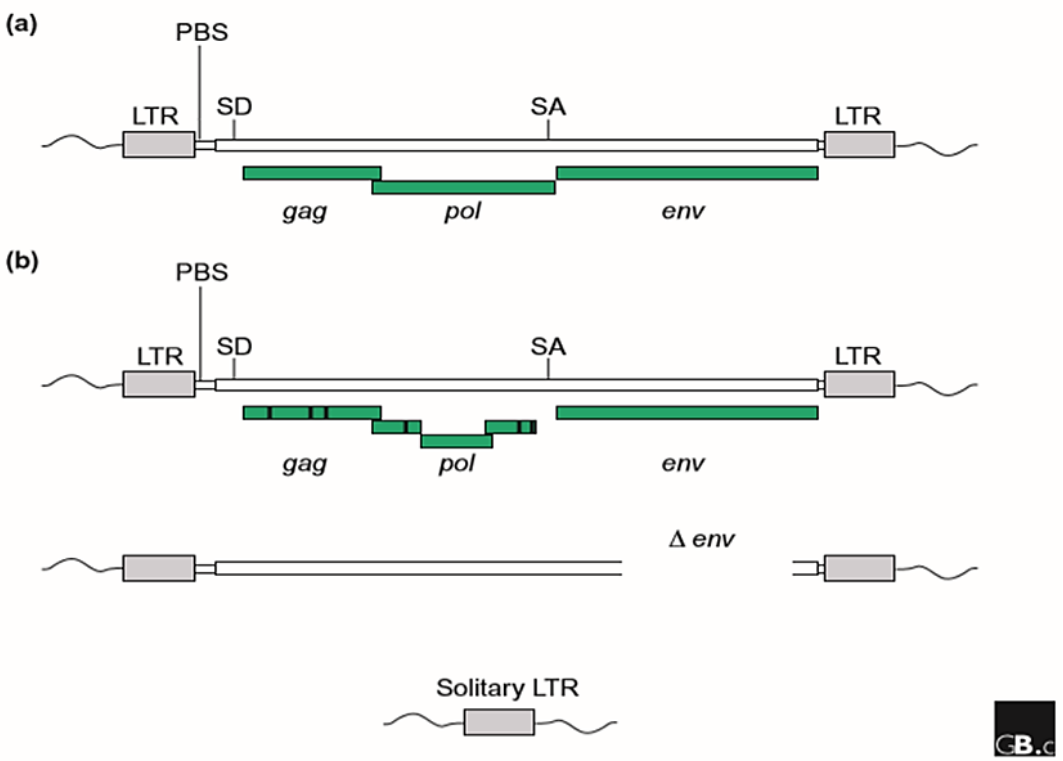

Abbildung 1.3: *Struktur retroviraler Proviren.* ***(a)*** *Infektiöse Retroviren mit vollständiger Struktur, bestehend aus den drei Genen (env = Envelope Gen, gag = Gruppenspezifisches Antigen, pol = DNA-Polymerase Gen) sowie Kontroll- und Regulationselementen (LTR = Long terminal repeat, PBS = Primer-Bindungsstelle, SA = Splice acceptor SD = Splice donor,).* ***(b)*** *Humane endogene Retroviren mit inaktivierenden Mutationen wie z.B. Punktmutationen (dunkle Banden) oder als einzelne LTR durch homologe Rekombination (Griffiths, 2001).*

1.3.2 HERV in der allgemeinen Tumorgenese

In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen der erhöhten Aktivität spezifischer HERV-Familien und bestimmten malignen Neubildungen weiter konkretisiert (siehe Tabelle 1.1).

Einer der zentralen Mechanismen zur Tumorinduktion durch Retroviren ist die *de novo* Einfügung eines Provirus im zellulären Genom als sog. Insertionsmutagenese. Dadurch kann sowohl die Aktivität von Onkogenen (u.a. wnt-1) gesteigert, als auch die Funktion von Tumorsuppressorgenen (TSG) reduziert werden (Kassiotis, 2014). Grundsätzlich ist dieser Vorgang bei den immobilen HERV im Gegensatz zu den Vertretern in der Tierwelt nicht mehr möglich. Trotzdem bleibt die Suche nach übertragbaren und somit über Insertionen mutagenen HERV weiter ein wichtiges und kontrovers diskutiertes Forschungsgebiet (Ruprecht et al., 2008). Als vielversprechende Kandidaten gelten hierfür Mitglieder der HERV-K Familie, die als Ursache für die bereits beobachtete Produktion retroviraler (jedoch nicht pathogener) Partikel in Melanomzellen vermutet werden (Muster et al., 2003). Durch *in vitro* Rekonstruktionen konnten Vertreter dieser Gruppe sogar künstlich ihre Infektiösität wiedererlangen (Lee und Bieniasz, 2007).

Trotz der vielen inaktivierenden Mutationen codieren manche HERV über offene Leseraster (ORF) weiter für retrovirale Genprodukte (Tönjes et al., 1996), die dann zur Tumorgenese beitragen können. So produzieren die HERV-K (HML-2) Familien die potenziell onkogenen Proteine NP9 und Rec, die über eine Suppression des Promyelozytenleukämie-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors eine gesteigerte Expression des Protoonkogens c-myc verursachen können (Denne et al., 2007). Über diesen speziellen Fall hinaus besitzen offenbar durch env codierte Transmembranproteine eine immunsuppressive Domäne, wodurch Tumorzellen die körpereigenen Abwehrmechanismen unterdrücken können (Morozov et al., 2013). Des Weiteren kann es durch den repetitiven Charakter der HERV vermehrt zu nicht-allelischen homologen Rekombinationen und damit verbundenen Chromosomenaberrationen kommen (Campbell et al., 2014; Feschotte und Gilbert, 2012). Ein Bespiel für diesen potenziell onkogenen Rekombinationsmechanismus, an dem HERV beteiligt sind, ist die Genfusion von HERV-K_22q11.23 und ETV1 im Prostatakarzinom (Tomlins et al., 2007). Ein weiteres Instrument mit dem HERV zur Tumorgenese beitragen können ist die Regulation zellulärer Gene durch ihre LTR. Diese repetitiven Elemente sind in der Regel, beispielweise durch DNA-Methylierung (siehe Kapitel 1.4), supprimiert, können jedoch im deregulierten Zustand als Promotor bzw. Enhancer für Onkogene dienen (Romanish et al., 2010). So basiert die verstärkte Transkription des

Kolonie-stimulierenden-Faktor-1-Rezeptors (CSF1R) im Hodgkin-Lymphom auf der Aktivierung eines vorgelagerten LTR-Elements (Lamprecht et al., 2010). Darüber hinaus können aktive LTR die Expression der potenziellen Onkogene Interferon-Regulationsfaktor (IRF) 5 (Babaian et al., 2016) und *gasdermin-like* (GSDML) (Huh et al., 2008) steigern.

Tabelle 1.1: *Zusammenhang zwischen der Expression spezifischer HERV-Familien und bestimmten malignen Neoplasien.*

HERV-Familie	Maligne Neoplasie	Quelle
HERV-K	Pankreaskarzinom	(Li et al., 2017)
	Leukämie	(Depil et al., 2002)
	Mammakarzinom	(Wang-Johanning et al., 2001)
	Melanom	(Büscher et al., 2005) (Serafino et al., 2009)
	Keimzelltumor (Testis, Ovar)	(Herbst et al., 1996)
HERV-R	Lungenkarzinom	(Ahn und Kim, 2009)
	Leberkarzinom	
HERV-E	Prostatakarzinom	(Wang-Johanning et al., 2003)
HERV-H	KRK	(Wentzensen et al., 2007)
HERV-W	Seminom	(Gimenez et al., 2010)

1.3.3 HERV-H im Bezug zum KRK

Die ersten Infektionen des menschlichen Genoms mit HERV-H fanden vor über 40 Millionen Jahren statt. Mittlerweile bilden diese die größte Gruppe der HERV (Yi et al., 2006). Die hohe Anzahl an vollständigen Proviren im Verhältnis zu einzelnen LTR ist dabei ein Hinweis für den besonders langsamen Abbau dieser HERV-Familie (Römer et al., 2017). Wie viele andere Familien ist auch diese möglicherweise an der Tumorgenese beteiligt (siehe Tabelle 1.1). Besonders in Zelllinien des KRK lässt sich bei rund 50 % der Proben eine erhöhte Expression eines spezifischen HERV-H Locus (X00041_h_gag) auf dem Chromosomen Xp22.3 beobachten (Pérot et al., 2015; Wentzensen et al., 2007). Die Demethylierung im Bereich des 5´-LTR ist dabei ein möglicher Hinweis auf eine epigenetische Beteiligung bei dieser aberranten Expression (Wentzensen et al., 2007) Für einen env-enthaltenden ORF auf Xp22.3 konnte spezifisch das immunogene Potenzial nachgewiesen werden, indem zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die für diese retroviralen Peptide spezifisch sind, zu einer Interferon-gamma (IFN-γ) Produktion mit Tumorzelllyse führten (Mullins und Linnebacher, 2012b). Neben dem X-Chromosom konnten auch auf den Chromosomen 5, 13, 14 und 20 aktive HERV-H Loci, jedoch in einem geringeren Umfang, beschrieben werden. Klinisch zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression dieser Gene und dem Ausmaß der Lymphknoteninfiltration (Pérot et al., 2015). Über die RNA-Ebene hinaus konnte mit Hilfe von anti-gag-H Antikörpern (AK) auch das Vorhandensein von HERV-H spezifischen (Fusions-)Proteinen insbesondere im KRK, und teilweise auch in normalen Kryptenzellen, nachgewiesen werden (Mullins et al., 2016). Dabei zeigte sich für ein Hüllprotein, das spezifisch für HERV-H ist, ein immunsuppressiver und somit potenziell tumorfördernder Effekt (Mangeney et al., 2001). Außer bei malignen Neoplasien spielt diese Familie der HERV auch bei der Entstehung anderer Erkrankungen, wie beispielweise der Multiplen Sklerose, möglicherweise eine Rolle (Christensen, 2017).

1.4 DNA-Methylierung

1.4.1 Einführung

Unter dem Begriff Epigenetik werden meiotisch oder mitotisch vererbte Veränderungen der Genexpression zusammengefasst, denen keine Modifikationen der DNA-Sequenz zugrunde liegen (D'Urso und Brickner, 2014). Einer der wichtigsten Mechanismen ist hierbei die eingangs erwähnte DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden (siehe Kapitel 1.1.3). Diese Veränderung betrifft in der Regel das gesamte humane Genom, inklusive repetitiver Sequenzen, Enhancern, Promotoren und *gene bodys*. Hierfür wird durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) am Cytosin des Dinukleotids eine Methylgruppe an das C5-Atom des Pyrimidinrings (5mC) angelagert (Lim und Maher, 2011). Grundsätzlich sind drei verschiedene DNMT bekannt: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Während die DNMT1 der Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters bei der Replikation dient, ist die DNMT3-Gruppe eher für die *de novo* Methylierung, beispielweise bei der elterlichen Prägung, verantwortlich (Cheung et al., 2009). Die DNA-Methylierung verhindert zum einen die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Viel wichtiger jedoch ist die Rekrutierung eines sog. Repressorkomplexes, der über eine Histonmodifizierung zu einer kondensierten und somit inaktiven Chromatinstruktur (Heterochromatin) führt (Lim und Maher, 2011). Eine Hypermethylierung der DNA verursacht also die verminderte Transkription des betroffenen Bereichs und eine Hypomethylierung entsprechend das Gegenteil (Klein und Costa, 1997). Im menschlichen Genom enthalten rund 70 – 80 % der CpG-Dinukleotide 5mC-Strukturen (Jang et al., 2017) die somit zu einer globalen Inaktivierung führen und dabei helfen nicht-codierende Regionen zu supprimieren. Insbesondere die Unterdrückung von potenziell schädlichen Transposons oder viralen Sequenzen in der DNA ist dabei ein wichtiges Ziel der globalen DNA-Methylierung (Baylin, 2005). Im Kontrast dazu stehen die im Allgemeinen unmethyliert vorliegenden CpG-Inseln, die in den Promotorregionen von rund 56 % aller humanen Gene lokalisiert sind und somit deren Transkription unterstützen (Suzuki und Bird, 2008).

1.4.2 Veränderungen in der Tumorgenese

In Tumoren liegen oft epigenetische Veränderungen vor, bei denen häufig abnormale Hypo- und Hypermethylierungen in verschiedenen Bereichen parallel auftreten (Cheung et al., 2009).

Dabei unterdrückt eine lokale Promotor-Hypermethylierung im KRK nicht nur das MMR (siehe Kapitel 1.1.3), sondern auch diverse TSG (Esteller, 2002). Betroffene Gene sind dabei u.a. FAS (Manoochehri et al., 2016), p16 (Goto et al., 2009) oder die *large tumor suppressor kinase 1* (Wierzbicki et al., 2013). Außerdem kann 5mC als instabile Base leicht zu Thymin desaminiert werden. Die so veränderte Basenabfolge kann TSG inaktivieren oder über ein frühzeitiges Stopcodon Translationsabbrüche wichtiger zellulärer Gene verursachen (Lim und Maher, 2011). Häufiger als die lokale Steigerung zeigt sich jedoch eine globale Verminderung der DNA-Methylierung (Ehrlich, 2002). Die Gruppe um Feinberg wies schon 1988 im Genom von kolorektalen Adenomen und KRK einen insgesamt um 8 – 10 % reduzierten Gehalt an 5mC nach (Feinberg et al., 1988). So liegt das häufig überexprimierte Onkogen c-myc in rund 66 % aller Adenokarzinome des Kolons und sogar in etwa 83 % der entsprechenden Metastasen an einer spezifischen Position hypomethyliert vor (Sharrard et al., 1992). Neben der Expressionssteigerung bestimmter tumorfördernder Gene können aber auch viele transponierende Elemente wie beispielweise die *long interspersed nuclear elements 1* (LINE-1) durch Hypomethylierung reaktiviert werden. Durch erneute Transposition können diese dann möglicherweise die Expression zellulärer Gene beeinflussen (Esteller und Herman, 2001). Außerdem ist in verschiedenen Tumoren die Hypomethylierung von Satelliten-DNA beschrieben worden (Kisseljova und Kisseljov, 2005). Diese nicht-codierenden Abschnitte sind häufig in heterochromatischen Bereichen, z.B. in der Nähe von Centromeren, lokalisiert und können bei einer Demethylierung die Chromatinstruktur und genomische Stabilität beeinträchtigen (Ehrlich, 2002).

1.4.3 Medikamentöse Beeinflussung

1.4.3.1 Azathioprin

Das Immunsuppressivum Azathioprin (AzaT) wird primär zur Behandlung von autoimmun bedingten Leiden bzw. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) oder zur Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt (Azimi et al., 2014). Im Rahmen des Metabolismus fungiert AzaT als Prodrug von 6-Mercaptopurin (6-MP), welches ebenfalls als eigenständiges Medikament verfügbar ist (Cuffari, 2006). Gemeinsam mit 6-Thioguanin (6-TG) werden diese zwei Wirkstoffe zu der Gruppe der Thiopurine zusammengefasst (Yuan et al., 2011). Hierbei kann 6-MP initial durch die Xanthinoxidase oder die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) inaktiviert werden. Es gilt jedoch einen funktionseinschränkenden Polymorphismus der TPMT zu beachten, der bei rund 10 % der Bevölkerung vorliegt und eine schwere Intoxikation mit AzaT verursachen kann (Dean, 2012). Andererseits wird 6-MP über verschiedene Zwischenschritte zu aktiven 6-TG Nukleotiden metabolisiert. Diese hemmen auf zwei Wegen die Proliferation der T-Lymphozyten und wirken somit immunsuppressiv. Neben der Inkorporation dieser Purinantagonisten in die DNA steht die Apoptoseinduktion durch eine *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) Blockade im Vordergrund (Cuffari, 2006; Turner und Pirmohamed, 2015). Die 6-TGN Synthesevorstufen können durch die TPMT jedoch auch zu aktiven Metaboliten wie z.B. Methylthioinosinmonophosphat verstoffwechselt werden, die als Inhibitoren der *de novo* Purinsynthese (DNPS) in Erscheinung treten.

Eine mögliche Beeinflussung des DNA-Methylierungsstatus besteht nun darin, dass neben der TPMT auch die DNMT als Methylgruppendonator das S-Adenosylmethionin nutzt, dessen Bildung wiederum von der DNPS abhängig ist. So kann sowohl eine hohe Aktivität der TPMT, als auch eine starke Hemmung der DNPS über eine Verringerung des S-Adenosylmethionin-Spiegels die DNA-Methylierung reduzieren. Obwohl der exakte Reaktionsweg noch nicht abschließend identifiziert ist, konnte *in vivo* durch eine Behandlung mit 6-MP eine globale Hypomethylierung induziert werden (Hogarth et al., 2008). Auch durch die Behandlung mit 6-TG wurde in T-Zellen einer akuten lymphatischen Leukämie die Abnahme des Methylierungsgrades induziert. Dabei konnten sogar Gene, die zuvor durch diesen epigenetischen Effekt ausgeschaltet wurden, reaktiviert werden (Yuan et al., 2011).

1.4.3.2 Azacitidin

Das in den 1960er Jahren erstmals hergestellte Medikament Azacitidin (AzaC) ist ein chemisch synthetisiertes Nukleosidanalogon, bei dem, im Gegensatz zu Cytidin, im Pyrimidinring das fünfte C-Atom durch Stickstoff ersetzt wurde (Raj und Mufti, 2006). AzaC wird primär in der Therapie des Myelodysplastischen Syndroms, der akuten myeloischen Leukämie oder der chronischen myelomonozytären Leukämie eingesetzt (Derissen et al., 2013). Das in die DNA eingelagerte AzaC kann über eine irreversible Bindung insbesondere die DNMT1 inaktivieren und wird daher mit weiteren Nukleosidanaloga wie Decitabin und Zebularin zu der Gruppe der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTI) zusammengefasst. Als Folge der Demethylierung können TSG, die in malignen Neoplasien durch eine Hypermethylierung der CpG-Inseln häufig inaktiv vorliegen, reaktiviert werden (Christman, 2002; Gnyszka et al., 2013). So wurde beispielweise *in vitro* beim KRK durch eine AzaC-Therapie die Transkription des TSG $p16^{INK4a}$ gesteigert (Schneider-Stock et al., 2005). Zusammengefasst können mögliche Effekte dieser Genreaktivierungen verstärkte Zelldifferenzierung und Apoptose, sowie eine verminderte zelluläre Proliferation sein (Gnyszka et al., 2013). AzaC kann durch eine Demethylierung der DNA aber auch insbesondere die Transkription der HERV verstärken (Laska et al., 2013). So wurde konkret in Teratokarzinomzelllinien die Expression von Teilen der HERV-K Familie, die dort ORF für die Gene gag, pol und env besitzt, durch eine Behandlung mit AzaC gesteigert. Außerdem wurde die Produktion Retrovirus-artiger Partikel verstärkt (Götzinger et al., 1996). Diese Hochregulation der ERV scheint einen weiteren zentralen Wirkmechanismus der DNMTI darzustellen. Denn, neben der Induktion der retroviralen doppelsträngigen RNA, werden durch die DNMTI auch die zugehörigen zytosolischen Rezeptorproteine wie *toll-like receptor 3* (TLR3) oder *melanoma differentation antigen 5* (MDA5) aktiviert. Über die Produktion von Interferon-beta (IFN-β) und der folgenden Induktion der Interferon-stimulierten Gene wird eine antivirale Immunantwort mit einer anschließenden Apoptose der Tumorzellen ausgelöst (Chiappinelli et al., 2017). *In vitro* wurde außerdem das Wachstum von intestinalen Tumororganoiden durch eine Decitabintherapie deutlich reduziert. Auch in diesen behandelten Zellen lagen viele Gene, die in die antivirale bzw. auf Interferon-basierte Immunantwort involviert sind, verstärkt exprimiert vor (Saito et al., 2016). Eine Monotherapie des KRK mit AzaC zeigte *in vivo* jedoch keine Hemmung der Tumorprogression. Trotzdem konnte bei anderen soliden Tumoren, wie dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, ein adjuvanter Effekt der DNMTI in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika gezeigt werden (Azad et al., 2017).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Neben der klassischen operativen Entfernung, sowie der Chemo- und Strahlentherapie liegt der aktuelle Fokus bei der Erforschung neuer Behandlungsoptionen des KRK auf der Immuntherapie. Bisher reagieren diese Karzinome aufgrund geringer immunogener Zielstrukturen eher schlecht auf diese neuartigen Behandlungsstrategien. Von HERV-H abgeleitete Epitope, die bereits *in vitro* erfolgreich durch CTL attackiert wurden (Mullins und Linnebacher, 2012b), könnten daher die Immunogenität für einen möglichen Immuntherapieansatz steigern. Durch eine Suppression der physiologischen Hypermethylierung mittels demethylierender Substanzen sollen durch diese mehrstufigen modellhaften *in vitro* Analysen (siehe Abbildung 1.4) Zelllinien mit einer gesteigerten Immunogenität erzeugt werden. Nach aktueller Literatur wird erstmals solch ein breit aufgestellter Ansatz an einer umfangreichen KRK-Tumorbank umgesetzt und stellt somit das erklärte Kernziel dieser Arbeit dar. Als abschließende Fragestellung ergibt sich, welche der KRK-Zelllinien nach stattgefundener HERV-H Induktion durch ihre immunologischen Oberflächenproteine potenzielle Ziele eines experimentellen Immuntherapieansatzes darstellen könnten. Durch die Angliederung an die Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock konnte die Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie (AG MOI) viele Patienten-abgeleitete KRK-Zelllinien etablieren und für diese Analysen bereitstellen.

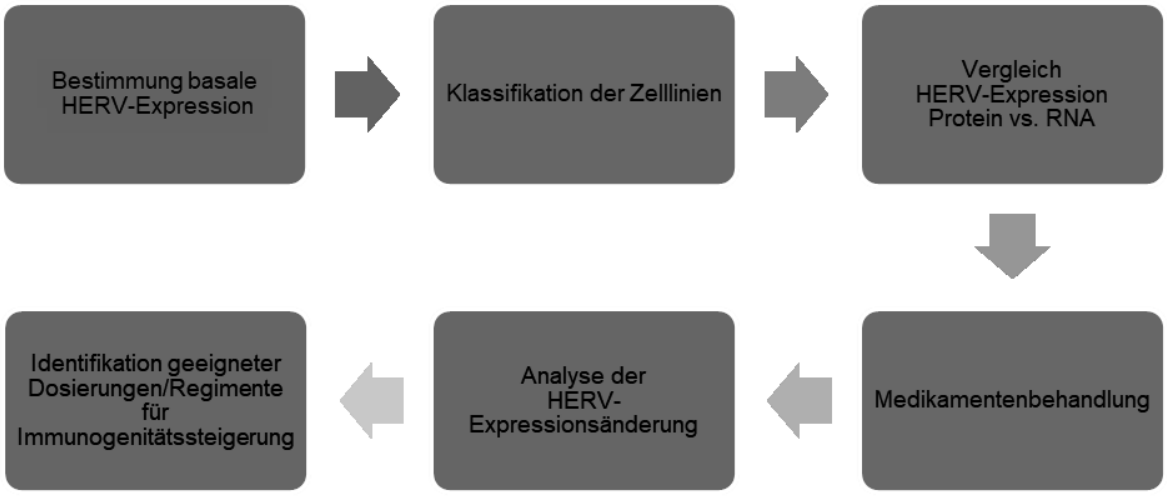

***Abbildung 1.4**: Übersicht der mehrstufigen HERV-H in vitro Analysen dieser Arbeit. Diese umfassen ein basales Screening mit Klassifikation, den Vergleich der RNA- und Proteinexpression, sowie die Identifikation möglicher medikamentöser HERV-H Induktionen.*

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Brutschrank Typ INC 246	Memmert (Schwabach, DE)
Durchflusszytometer FACS Calibur™	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
Geldokumentationskammer BIO-Print ST4	Vilber Lourmant (Eberhardzell, DE)
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Grafiktaschenrechner TI-83 Plus	Texas Instruments (Dallas, USA)
Heizplatte	Diagnostics Pasteur (Lyon, FR)
Kühlgeräte:	
• Kühlschrank: 4 °C	Liebherr Hausgeräte (Ochsenhausen, DE)
• Tiefkühlschrank: -20 °C	Bosch Hausgeräte (München, DE)
• Tiefkühltruhe: -30 °C	Kryotec-Kryosafe (Hamburg, DE)
• Tiefkühltruhe: -80 °C	Kryotec-Kryosafe
Lichtmikroskop Primo Vert	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mehrfachdispenser Handy Step® S	Brand (Wertheim, DE)
Mehrkanalpipette	Eppendorf (Hamburg, DE)
Mikroskopkamera Axiocam 105 Color	Zeiss
Mikrowelle	Bosch Hausgeräte
Multiplate Reader Infinite® 200	Tecan (Männedorf, CH)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy acu2	Integra Biosciences (Neu-Ulm, DE)
Real-Time PCR Cycler ViiA™ 7	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)

Schüttler:	
• MS2 Minishaker	IKA (Staufen, DE)
• Rocker 3D	IKA
Sicherheitswerkbank Safemate 1.8. Vision	BioAir-Euroclone (Pero, IT)
Spannungsgeber Power Ease 500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Thermal Cycler MyCycler™	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences
Waage	Kern & Sohn (Balingen-Frommern, DE)
Wasserbad WiseBath (Wb6)	TQC (Hilden, DE)
Zentrifugen:	
• Microzentrifuge 5415D	Eppendorf
• Zentrifuge Rotina 38	Hettich (Tuttlingen, DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Thermo Fisher Scientific
Dispenser-Tips	Brand
Durchflusszytometrieröhrchen 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
FACS Polypropylen (PP) Röhrchen (1,3 ml)	Greiner-Bio-One (Kremsmünster, AT)
Klebefolie PCR-Platte	Sarstedt
Kryogefäße	Sarstedt
Kryoeinfriercontainer CoolCell	BioCision (San Rafael, USA)
Mikrotiterplatten Cellstar® (12; 96 Well)	Greiner-Bio-One
Pasteurpipetten	Fisher-Scientific (Hampton, USA)

PCR 8er Softstripes	Brand
PCR-Platte Halbrand 96-FAST für ViiA™ 7	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten Cellstar® (2, 4, 10 ml)	Greiner Bio-One
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld (Lauda Königshofen, DE)
Zellkulturflaschen (T25; T75; T175)	Greiner-Bio-One

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Azacitidin	Hycultec (Beutelsbach, DE)
Azathioprin Imurek®	Aspen Pharmacare (Durban, ZAF)
Bacillol® AF	Hartmann (Heidenheim a.d. Brenz, DE)
ß-Mercaptoethanol	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Complete (5x) Reaction buffer	Bioron (Ludwigshafen, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt, DE)
DMEM/F12 (Dulbecco`s Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12)	PAN Biotech (Aidenbach, DE)
DNA-Leiter 50 bp	Bioron
DNAse (Desoxyribonuklease) I (Recombinant RNAse free, 10 U/µL)	Roche (Basel, CH)
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate) working 10 mM	Bioron
Ethanol absolut	Walter CMP (Kiel, DE)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Fetales Kälber Serum (FKS)	PAN Biotech

Formafix 4 % gepuffert	Grimm med. Logistik (Torgelow, DE)
Gene Matrix Universal RNA Purification Kit	EURx (Danzig, PL)
Genomische DNA (gDNA) Mix	AG MOI
H_2O (Nuklease-frei)	Macherey-Nagel (Düren, DE)
HEPES (2-Ethansulfonsäure)	AppliChem
Kristallviolett (KV)	AppliChem
L-Glutamin	PAN Biotech
Loading Dye	Promega (Madison, USA)
Oligonukleotide	Metabion (Planegg, DE)
Penicillin G	Jenapharm (Jena, DE)
Phosphat buffered saline (PBS)	PAN Biotech
Reverase (M-MuLV, Rnase H minus) 200 IU/µL	Bioron
Rox 25 µM	EURx
Saponin	Carl Roth
SibirRoxHot Master Mix, low Rox 2x	Bioron
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Streptomycin	Riemser Pharma (Greifswald, DE)
TAE (TRIS-Acetat-EDTA) Puffer (50x)	AppliChem
TaqMan Mastermix 2x	Bioron
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin + EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	PAN Biotech
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.4 Antikörper

Anti-His AK (2G2B3)	Qiagen (Venlo, NL)
Anti-human HLA-A/-B/-C (MHC-I) Phycoerythrin (PE)	Immunotools (Friesoythe, DE)
Anti-human HLA-DP/-DR (MHC-II) Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Immunotools
Anti-gag AK (HERV-H):	
• 1B3H7 • 1D7D11 • 2H2D6 • 14H11G1	BioMérieux SA (Marcy-l'Étoile, FR) (Mullins et al., 2016)
HLA-A2 Zellkulturüberstand Klon BB7.2	AG MOI
Polyclonal Rabbit F(ab')2 Anti-Mouse Immunglobulins	Dako (Glostrup, DK)

2.1.5 Medien und Lösungen

Einfriermedium:	90 % FKS, 10 % DMSO
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) System Hex 20x (100 µl):	10 µl (10 µM) forward Primer, 10 µl (10 µM) reverse Primer, 2 µl (2 µM) Sonde, 78 µl H_2O (Nuklease-frei)
KV-Lösung:	100 ml destilliertes Wasser, 2 ml Ethanol absolut, 200 mg KV
Puffer P (100x):	PBS mit 1 % FKS; 0,03 % Saponin; 0,01 M HEPES
SDS (1 %):	1 g SDS; 100 ml destilliertes Wasser
Trypanblau (1x):	0,4 g Trypanblau, 100 ml PBS
Vollmedium:	DMEM/F12 mit 10 % FKS; 7 % L-Glutamin (200 mM), 10 IE/ml Penicillin und 130 µg/ml Streptomycin

2.1.6 Zelllinien

Für die Analysen wurde mit maximal n = 28 verschiedenen Zelllinien kolorektaler Adenokarzinome gearbeitet. Alle Linien sind Bestandteil der erweiterten Tumorbiobank der AG MOI der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock. Die Nomenklatur der meisten Zelllinien ist durch eine individuelle Nummerierung in Verbindung mit der Kennzeichnung „HRO“ für Rostock und „C“ für Kolon definiert. Die Bezeichnung „Met“ steht hierbei für Metastase, „BMC“ für Hirnmetastase. Es wurde sowohl mit primären Zelllinien aus Patienten, als auch mit *patient derived xenografts* (PDX) gearbeitet. Letztere werden durch die Transferzahl (T), sowie durch die Mauskennzeichnung (M) charakterisiert. In Tabelle **2.1** sind die Eigenschaften aller verwendeten Zelllinien dargestellt.

Tabelle 2.1: *Charakterisierung der verwendeten KRK-Zelllinien aus der AG MOI nach klinischen Eigenschaften, molekularem Subtyp, MSI-Status und Besonderheiten. Die Abkürzung spSTD (sporadisch, standard) bezeichnet hierbei das klassische CIN$^+$ KRK.*

Bezeichnung	Ursprungslokalisation, Geschlecht, Alter	MSI-Status	Mol. Typ	Besonderheiten
HROC18	Coecum, ♂, 65 J	MSS	spSTD	-
HROC24	Ascendens, ♂, 98 J	MSI	spMSI	-
HROC24 T1 M1				-
HROC40	Descendens, ♂, 69 J	MSS	CIMP-L	-
HROC43	Ascendens, ♂, 79 J	MSS	CIMP-L	-
HROC46 T0 M1	Ascendens, ♂, 66 J	MSS	spSTD	-
HROC50 T1 M5	Ascendens, ♀, 67 J	MSI	spMSI	-
HROC59 T1 M1	Ascendens, ♂, 76 J	MSS	spSTD	-
HROC69	Ascendens, ♂, 62 J	MSS	spSTD	Morbus Crohn, nach AzaT-Therapie
HROC69 T0 M2				-
HROC87 T0 M2	Ascendens, ♀, 76 J	MSI	spMSI	-
HROC131 T0 M3	Ascendens, ♀, 75 J	MSI	spMSI	-
HROC147 T0 M1	Rektosigmoid, ♂, 54 J	MSI-L	CIMP-L	-
HROC147Met				Lebermetastase
HROC173	Ascendens, ♂, 45 J	MSS	spSTD	-

Bezeichnung	Ursprungslokalisation, Geschlecht, Alter	MSI-Status	Mol. Typ	Besonderheiten
HROC239 T0 M1	Rektum, ♀, 72 J	MSS	-	-
HROC257 T0 M1	Ascendens, ♀, 84 J	MSI	spMSI	-
HROC278 T0 M1	Ascendens, ♀, 76 J	(MSI-L)	CIMP-H	-
HROC278Met T2 M2				Peritonealmetastase
HROC285 T0 M2	Descendens, ♀, 30 J	MSI	HNPCC	-
HROC296	Ascendens, ♀, 92 J	MSS	-	-
HROC309	Descendens, ♂, 86 J	MSS	-	-
HROC313Met1 T0 M2	Sigma, ♂, 72 J	MSS	-	Lungenmetastase
HROC324	Coecum, ♀, 55 J	MSI	HNPCC	-
HROC364	rechte Kolonflexur, ♂, 77 J	-	-	-
HROBMC01	Kolon, ♀, 60 J	MSS	spSTD	Hirnmetastase

2.1.7 Software

I_control 1.9 (Multiplate Reader)	Tecan
ND-1000 V.3.7.1 (Nanodrop)	Thermo Fisher Scientific
Office Professional 2010	Microsoft (Redmond, USA)
Prism5 (Statistik & Grafiken)	GraphPad Software (La Jolla, USA)
QuantStudio™ (Real-Time PCR)	Applied Biosystems
Vision Capt (Geldokumentation)	Vilber Lourmant
ZEN core (Mikroskopkamera Axiocam 105 Color)	Zeiss
Zotero (Literaturverwaltung)	George Mason Universität (Washington DC, USA)

2.1.8 Formatierung

Wissenschaftliche Arbeiten schreiben mit Word 2010 (7. aktualisierte Auflage 2011)	Natascha Nicol, Ralf Albrecht (Addison-Wesley Verlag)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Grundlagen

Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgte als Monolayer in Zellkulturflaschen verschiedener Größen (T25; T75; T175). Die für die Inkubation nötige Umgebung wurde im Brutschrank (Temperatur: 37 °C, mit 5 % CO_2 angereicherte Atmosphäre) sichergestellt. Der durch die zunehmende Mediumverstoffwechselung verringerte pH-Wert verursachte einen Farbumschlag des enthaltenen Phenolrots von Rot zu Gelb. Alle Zellkulturarbeiten, inklusive der folgenden Medikamentenbehandlungen, wurden an der mit „Bacillol® AF“ desinfizierten Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Die Sterilität der Verbrauchsmaterialen wurde durch das Verwenden von Einmalartikeln oder bei 121 °C autoklavierten Glasutensilien gewährleistet.

2.2.1.2 Passagieren der Zellen und Zellzahlbestimmung

Bei einem flächendeckenden Wachstum (>70 – 90 % Konfluenz) mussten die Zellen passagiert werden. Nach dem Absaugen des Vollmediums erfolgte ein Waschschritt mit sterilem PBS. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA in die flüssigkeitsfreie Flasche mit einer anschließenden Inkubation für 10 min bei 37 °C lösten sich die adhärent wachsenden Zellen vom Boden. Abhängig von der Flaschengröße wurden entweder 0,5 ml (T25), 1 ml (T75) oder 2 ml (T175) Trypsin/EDTA verwendet. Die in ein 15 ml PP-Röhrchen aufgenommenen Zellen konnten nun der Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau zugeführt werden. Dieser saure Diazofarbstoff färbt bei einem Zellmembrandefekt zytosolische Proteine an. Durch diese sog. Vitalfärbung lassen sich daher die ungefärbten lebenden Zellen von den deutlich blau erscheinenden avitalen Zellen unterscheiden. Die Zellsuspension wurde nun im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau vermengt und unter Verwendung einer Neubauerkammer gezählt. Durch das lichtmikroskopische Betrachten von zwei Großquadraten mit je n = 16 Unterteilungen konnten die vitalen Zellen (N) gezählt werden. Mit dem Einsetzen des Verdünnungsfaktors (V_f) und der Anzahl der ausgezählten Großquadrate (Q), die beide in diesem Fall zwei betrugen, sowie der Multiplikation mit dem Kammerfaktor 10^4 konnte die Zellanzahl pro Milliliter (D) gemäß der folgenden Formel bestimmt werden:

$$\boldsymbol{D = \frac{N}{Q} \times V_f \times 10^4}$$

Anschließend wurden die Zellen abhängig von der Anzahl mit verschiedenen Volumina des Vollmediums in T25 (5 ml), T75 (10 ml) oder T175 (20 ml) Zellkulturflaschen gegeben oder kryokonserviert.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Das Konservieren niedriger Passagen der einzelnen Zelllinien ist ein wichtiger Mechanismus um ähnliche Versuchsbedingungen auch über einen längeren Zeitraum zu garantieren. Das hierfür verwendete organische Lösungsmittel DMSO ist ähnlich wie Glycerin ein sog. „Frostschutzmittel“. Mit FKS verdünnt (1 : 10) verhindert es als Einfriermedium die Eiskristallbildung und die damit einhergehende Zerstörung der Zellen. Die ersten Arbeitsschritte der Kryokonservierung stimmen bis zur Feststellung der Zellanzahl mit denen der Passage überein. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 180 g und dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen in Einfriermedium gelöst. Zur Befüllung eines 1,5 ml Kryogefäßes wurden üblicherweise 3 Millionen Zellen benötigt. Das schonende Abkühlen der Zellen um lediglich 1 °C pro Minute im Kryoeinfriercontainer auf bis zu -80 °C sicherte zusätzlich die Zellqualität. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend mussten sie mit 10 ml PBS gespült werden um das bei Raumtemperatur (RT) zytotoxische DMSO zu entfernen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 180 g konnte die Pufferlösung abgesaugt werden und die Tumorzellen wurden in die entsprechenden Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.4 Kristallviolettassay

Der Assay mittels KV ist eine verbreitete Methode zur Bestimmung der Vitalität einer adhärent wachsenden Zellkultur und somit dafür geeignet die Zytotoxizität von Substanzen zu beurteilen (Feoktistova et al., 2016). Nach Entfernung des Mediums wurden die Mikrotiterplatten mit je 100 µl (96-Well-Platte) oder 2 ml (12-Well-Platte) PBS je Vertiefung gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgte pro Kavität mit 50 µl (96-Well-Platte) oder 200 µl (12-Well-Platte) KV-Lösung. Nun schloss sich eine Inkubation für 10 min auf dem Schüttler an. Der o.g. Waschschritt mit PBS wurde anschließend zweimal durchgeführt, um Verunreinigungen durch überschüssiges, nicht an Zellen gebundenes, KV zu verhindern. Nach einer Trocknung für ≥3 h bei RT wurde das KV der Platten durch 1 %iges SDS gelöst. Bei 96-Well-Platten wurden mittels einer Mehrkanalpipette pro Kavität 100 µl dieser Flüssigkeit hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei RT für 10 min auf dem Schüttler. Demgegenüber stand eine Resuspension mit 2 ml SDS-Lösung für 16 h bei 12-Well-Platten. Die Absorptionsmessung mit n = 16 verschiedenen Messpunkten pro Kavität bei einer Wellenlänge von 570 nm erfolgte am „Multiplate Reader Infinite® 200“. Traten bedingt durch zu hohe Absorptionswerte Fehler bei mehr als 3/16 Messpunkten auf, wurden alle einander zugehörigen Kavitäten im Verhältnis 1 : 2 verdünnt und erneut gemessen. Von den Absorptionsergebnissen der n = 16 verschiedenen Messpunkte wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) bestimmt.

2.2.2 Molekularbiologische Verfahren

2.2.2.1 RNA-Isolation

Bis auf β-Mercaptoethanol, Ethanol 70 % und die DNAse I stammten alle Reagenzien aus dem „RNA Purification Kit“ von EURx. Nach dem Auftauen des Zellpellets (3 x 10^6 Zellen) musste dieses mit 400 µl einer β-Mercaptoethanol/Puffer RL Lösung (1 : 100) resuspendiert werden. Es folgte die Übertragung der Zellsuspension auf die Homogenisierungssäule mit anschließender Zentrifugation für 2 min bei 180 g. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation erfolgten nun gemäß den Herstellerangaben des verwendeten Kits. Zur Erhöhung der Reinheit wurde zusätzlich ein DNAse-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl der mit DNR-Puffer im Verhältnis 1 : 500 verdünnten DNAse I mittig auf die Säulenmembran aufgetropft, gefolgt von einer Inkubation für 10 min. Nach Abschluss aller Arbeitsschritte wurde die Säule auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 – 50 µl RNAse-freiem Wasser betropft. Die Lagerung der frisch isolierten RNA erfolgte ab sofort für alle weiteren Arbeitsschritte durchgängig auf Eis.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde am Spektralphotometer „Nanodrop 1000“ durchgeführt. Nach dem obligatorischen Spülen und der Blankwertbestimmung mit 1,5 µl Nuklease-freiem Wasser erfolgte die Probenmessung mit gleichen Volumina. Die Absorption von ultraviolettem (UV) Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm stellt hier den Nachweis von Nukleinsäuren dar. Da bei einer Wellenlänge von 280 nm Verunreinigungen wie beispielweise Proteine das UV-Licht absorbieren, ist ein Absorptionskoeffizient A260/280 > 2 ein Indikator für eine gute RNA-Qualität. Um eine Kontamination mit DNA auszuschließen liefen Teile aller RNA-Proben bei der späteren GAPDH qRT-PCR ihrer zugehörigen komplementären DNA (cDNA) zur Kontrolle mit. Bei einem Ct-Wert > 35 galt die RNA-Probe als nicht oder akzeptabel gering kontaminiert.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte gemäß dem Bioron-Protokoll nach Herstellerangaben. Initial wurden 1 µg der isolierten RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf das Zielvolumen von 13 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl des entsprechenden Oligonukleotidmixes. Die final erreichten 14 µl Zielvolumen wurden nun für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 6 µl des Mastermixes (siehe Tabelle 2.2) wurde die eigentliche cDNA-Synthese am Thermal Cycler „MyCycler™“ über 120 min bei 45 °C und anschließend über 10 min

bei 70 °C durchgeführt. Nach der Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1 : 4 konnte die gelöste cDNA in eine 40 µl und zwei 20 µl Portionen aliquotiert werden. Die Lagerung bis zum nächsten Arbeitsschritt erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 2.2: *Mastermix cDNA-Synthese (Mengenangaben pro Kavität einer 96-Well-Platte).*

Komponente	Volumen (in µl)
5x RT Komplettpuffer	4,0
dNTP Mix (10 mM von jedem dNTP)	1,0
Reverase (TM) (200 U)	1,0
Summe:	**6,0**

2.2.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Die Bestimmung der relativen Expression (RE) der HERV-H auf RNA-Ebene erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR). Dafür wurden die Expressionswerte der verschiedenen für HERV-H spezifischen Primer (Pérot et al., 2015) in Bezug zur Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH gesetzt (Primerübersicht siehe Tabelle **2.3**). Alle nötigen Pipettier- und Transportschritte erfolgten gekühlt auf Eis. Pro Kavität der 96-Well-Platte wurden zu dem jeweiligen Mastermix (siehe Tabelle **2.4**) 1,5 µl der zuvor 1 : 4 verdünnten cDNA hinzugefügt, sodass das Zielvolumen von 12 µl erreicht werden konnte. Die Proben wurden dabei auf jeder Platte in Duplikaten angelegt. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich gDNA verwendet und die *non template control* diente als negative Referenz. Die qRT-PCR wurde am „ViiA™ 7 Cycler“ mit dem „QuantStudioTM“ als Software durchgeführt. Vor der Messung wurden durch Zentrifugation der Platten (180 g; 1 min) Bläschenbildung ausgeschlossen und die korrekten Volumina garantiert. Die Amplifikation für die GAPDH-Analyse bestand aus 10 min Denaturierung bei 95 °C mit anschließenden n = 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Der Ablauf für die HERV-H Primer startete mit einer identischen Denaturierung, gefolgt von n = 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C und 1 min bei Primer-spezifischen Annealingtemperaturen (T_m) (siehe Tabelle 2.3). Die für die Messung der für HERV-H spezifischen Primer (mittels auf SYBR Green basiertem System) benötigten Schmelzkurven wurden mit folgendem Temperaturablauf aufgezeichnet: 95 °C - 15 s; 65 °C - 1 min; 95 °C - 15 s. Final wurden dann die Ct-Werte der Duplikate, deren Schmelztemperatur mit dem Wert der Positivkontrolle übereinstimmte, gemittelt. Die RE der jeweiligen Primer errechnete sich durch die Formel:

$$\boldsymbol{RE = 2^{-(Ct_{Probe} - Ct_{GAPDH})}}$$

Tabelle 2.3: *Übersicht über die verwendeten GAPDH und HERV-H spezifischen Primer unter Angabe der Loci, Primersequenzen und Annealingtemperaturen (T_m) (Pérot et al., 2015).*

Primer	Locus	Primersequenzen 5´→3´	T_m (in °C)
X00041_h_gag	Chr. X 4468515-4474361	CAGGCGTTGCTGAGTGTGTCTAATCTGGA GCCTGAGGAAGAATTGGACC	65
2000045_h_gag	Chr. 20 19680691-19685420	CCCAAGCGGCGCTGAGTCTTTGGGATGAA GGGAGGGGAGGC	61
2000045_h_pol	Chr. 20 19680691-19685420	TACAGCATGGGCACCTATAAACTCTTAAGT GAAGGCAAAGAGAGGCTGGG	63
500502_h_L3U3	Chr. 5 135904531-135912105	CCCAGATGGCCTGAAGTAACTGAAGCCAG GAGAACAATTCACAGGGTT	65
1300360_h_gag	Chr. 13 108715439-108721465	AGTGCAACTCATTCTGAATCTTCCTCACAG AACGAAACTGTAAGCCAG	61
1300360_h_env	Chr. 13 108715439-108721465	CTGAACCTCCTTAGGCATTCTCTGTGACAT TGAGGGGGTTGTTAGAAG	59
1400035_h_gag	Chr. 14 30785319-30790095	CCCAAGTGTCGCTGAGTCTTTCTGATTACA GGGTGCAGGAGCAGAG	65
GAPDH	-	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; GAAGATGGTGATGGGATTTC	60

Tabelle 2.4: *Mastermix jeweils für HERV-H und GAPDH Primer im Rahmen der qRT-PCR (Mengenangaben pro Kavität einer 96-Well-Platte).*

HERV-H		GAPDH	
Lösung	**Volumen (in µl)**	**Lösung**	**Volumen (in µl)**
SibirRoxHot Master Mix	6,25	TaqMan Mastermix 2x	6,25
HERV-H Primer	1,25	GAPDH-System Hex 20	0,625
H_2O (Nuklease-frei)	3,00	Rox (c = 2,5 µM)	0,15
		H_2O (Nuklease-frei)	3,48
Summe:	**10,50**	**Summe:**	**10,50**

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Zur Ergebnisbestätigung der qRT-PCR wurden ausgewählte Probenduplikate und die Positiv- und Negativkontrollen einer Platte mittels Gelelektrophorese analysiert. Zur Auftrennung wurde ein 1 %iges Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid, verwendet. Vor dem Befüllen der Geltaschen wurden die Proben der qRT-PCR mit je 5 µl *loading dye* gemischt, um somit ein Verbleiben der Proben in den Taschen und ein optimales Laufverhalten zu gewährleisten. Als Referenz dienten auf jedem Gel 2 µl einer 50 bp Leiter. Die Elektrophorese lief bei 70 V für 15 min, gefolgt von 90 V für 45 min. Unmittelbar darauf fand die Betrachtung unter UV-Licht in der Geldokumentationskammer „BIO-Print ST4“ statt.

2.2.3 Medikamentenbehandlungen

2.2.3.1 IC_{50}-Bestimmung

Als Richtwert für das Therapieansprechen der Zellen wurde initial die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt, bei der definitionsgemäß ein Verlust vitaler Zellen von 50 % vorliegt. Zur Sicherstellung der klinischen Relevanz wurden die ermittelten Werte mit den üblichen Plasmakonzentrationen verglichen. Vor den folgenden Behandlungen wurden beide Substanzen mit DMSO gelöst, aliquotiert und zum Stabilitätserhalt bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationen dieser Aliquots betrugen bei AzaT c = 50 mM und bei AzaC c = 1 mM. Gelöst in 150 µl Vollmedium wurden die Zellen als Triplikate, aber je nach Linie mit unterschiedlicher Anzahl (siehe Tabelle A.1 im Anhang), auf 96-Well-Platten *(flat bottom)* ausgesät.

Nach dem Auftauen der benötigten Mengen im Wasserbad bei 37 °C konnten medikamentenspezifische Verdünnungsreihen im Verhältnis 1 : 5 (AzaT) und 1 : 3 (AzaC) aufgestellt werden. Nach der Zugabe von je 50 µl dieser Verdünnungsansätze zur 96-Well-Platte wurden final in den 200 µl Lösung pro Kavität die in Tabelle 2.5 dargestellten Konzentrationen erreicht. Pro Zelllinie wurden, ebenso in Triplikaten, Totkontrollen (5 µl Tween 20 in 200 µl Medium) und Lebendkontrollen (keine Wirkstoffzugabe) angelegt. Die Medikamentenbehandlung fand für 2 x 72 h statt. Die zwischenzeitliche Erneuerung der Substanzen ist eine Folge der eingeschränkten Medikamentenstabilität bei 37 °C. Die Wachstumskurven konnten nach Behandlungsende durch ein KV-Assay (siehe Kapitel 2.2.1.4) dargestellt werden. An der zugehörigen exponentiellen Ausgleichskurve wurde mit einem grafikfähigen Taschenrechner für y = 0,5 der zugehörige X-Wert (IC_{50}) ermittelt. Nach der Durchführung von mindestens zwei Messungen pro Zelllinie und Medikament konnten die jeweils errechneten IC_{50}-Werte gemittelt werden und bildeten die Basis für die finalen Substanzbehandlungen.

Tabelle 2.5: *Zielkonzentrationen beider Medikamente (AzaT, AzaC) zur IC_{50}-Bestimmung (Konzentrationsangaben pro Kavität einer 96-Well-Platte).*

Zielkonzentrationen pro Well (in µM)	
AzaT	**AzaC**
150	40,5
30	13,5
6	4,5
1,2	1,5
0,24	0,5
0,048	0,17

2.2.3.2 Finaler Ansatz

Das Ziel der finalen Behandlung ist es bei jeder Zelllinie, basierend auf den IC_{50}-Werten, mittels individuellen Medikamentenkonzentrationen eine maximale Induktion der HERV-H auf RNA-Ebene zu erreichen. Hierfür wurden pro Zelllinie und Behandlung auf drei 12-Well-Platten pro Kavität je 5×10^5 in 2 ml Vollmedium suspendierte Zellen ausgesät. Die Zellanzahl pro Kavität ist die achtfache der in Tabelle A.1 im Anhang beschriebenen Werte für 96-Well-Platten. Auf je einer der drei Platten erfolgte die Behandlung für 24; 72 und 2 x 72 h mit den in der Abbildung 2.1 dargestellten Konzentrationen bzw. Plattenbelegungen. Ein Mediumwechsel mit erneuter Medikamentengabe erfolgte nach 72 h bzw. zusätzlich bei deutlicher Mediumverstoffwechselung. Pro Medikamentenkonzentration auf einer Platte wurde je eine Kavität für die Wachstumskontrolle mittels KV-Assay genutzt. Aus den übrigen zwei Wells wurden zusammen mindestens 3×10^6 Zellen als Pellets geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

	AzaT				**AzaC**			
1	Kontrolle	IC_{50}	1/10 IC_{50}	2 µM	Kontrolle	IC_{50}	1/3 IC_{50}	1/10 IC_{50}
2	Kontrolle	IC_{50}	1/10 IC_{50}	2 µM	Kontrolle	IC_{50}	1/3 IC_{50}	1/10 IC_{50}
3	Kontrolle	IC_{50}	1/10 IC_{50}	2 µM	Kontrolle	IC_{50}	1/3 IC_{50}	1/10 IC_{50}
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**

Abbildung 2.1: *Belegungen der zwei verschiedenen 12-Well-Platten bei finaler Behandlung. Darstellung AzaT links (A – D) und AzaC rechts (E – H). Verwendung der behandelten Zellen für den KV-Assay zur Vitalitätskontrolle (Violett, Zeile 1) oder qRT-PCR (Grau, Zeile 2 und 3).*

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist eine Laser-basierte Technik zur Zählung und Charakterisierung von Zellen. Diese werden aus einer heterogenen Lösung heraus einzeln mit hoher Geschwindigkeit an verschiedenen Lasern vorbeigeführt. Das Vorwärtsstreulicht bzw. *forward scatter* (FSC) korreliert positiv mit der Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht bzw. *sideward scatter* (SSC), das im 90° Winkel zum Zellfluss gemessen wird, gibt die Granularität und Komplexität der Zellen wieder. Für die hier durchgeführten Analysen war zusätzlich die Fluoreszenzmessung von Bedeutung. Spezifisch für die jeweiligen Wellenlängen der verwendeten Fluorochrome (FITC, PE) können spezielle Sensoren (Photomultiplier) die Zellfluoreszenz unter dem Einfluss des Laserlichts detektieren, woraus sich das Ausmaß der Expression spezifischer Antigene ermitteln lässt.

2.2.4.2 Intrazelluläre Färbung

Da die HERV-H gag-Proteine in der Regel nicht membranständig positioniert sind, ist die intrazelluläre Färbung das Mittel der Wahl für den Nachweis dieser Strukturen. Es wurden pro Färbeansatz 5 x 10^5 Zellen mit 600 µl 2 %igem Formafix für 10 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Resuspension mit je 100 µl der sechs verschiedenen primären Färbeansätze (c = 1 g/l). Neben den vier für HERV-H spezifischen AK liefen zusätzlich zwei Negativkontrollen mit. Diese waren zum einen Puffer P, sowie ein irrelevanter anti-His AK (2G2B3). Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte pro Ansatz die Färbung mit 50 µl des sekundären AK (Polyclonal Rabbit F(ab‘)2 Anti-Mouse). Dieser FITC-markierte AK besaß die Konzentration c = 0,022 g/l. Nach dem Entfernen des sekundären AK mittels einer finalen Waschung wurden die gefärbten Zellen, gelöst in 200 µl PBS pro Kavität, auf den 96-Well-Platten bereitgestellt. Alle Färbeschritte erfolgten in Dunkelheit bei 4 °C.

2.2.4.3 Extrazelluläre Färbung

Die Ausprägung verschiedener humaner Leukozytenantigene (HLA) spielt eine entscheidende Rolle bei der Antigenpräsentation, sowie bei der Erkennung von Tumorzellen durch das körpereigene Immunsystem. Zur Bestimmung geeigneter KRK-Zelllinien (Immunoscreen) sollen in diesen die beiden Hauptklassen der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) mittels direkt markierter spezifischer AK extrazellulär nachgewiesen werden. Hierfür wurden HLA-DP/-DR (FITC), sowie HLA-A/-B/-C (PE) AK verwendet. MHC-I ermöglicht insbesondere über die ständige Präsentation von intrazellulärem Inhalt die Erkennung von Tumorzellen durch CTL. Zusätzlich wurde noch die Expression der in der westlichen Welt häufigsten HLA-A Ausprägung (HLA-A2.1) bestimmt. Diese wurde durch einen Zellkulturüberstand des Klons BB7.2 primär erkannt und anschließend durch den gleichen sekundären AK-Ansatz wie bei der intrazellulären Färbung markiert. Insgesamt wurden pro Zelllinie vier Ansätze mit je 3×10^5 Zellen benötigt, welche dann gemäß der Abbildung 2.2 den konkreten Arbeitsschritten der Färbung unterzogen wurden. Final wurden alle gefärbten Zellen in 250 µl PBS gelöst zur Messung bereitgestellt.

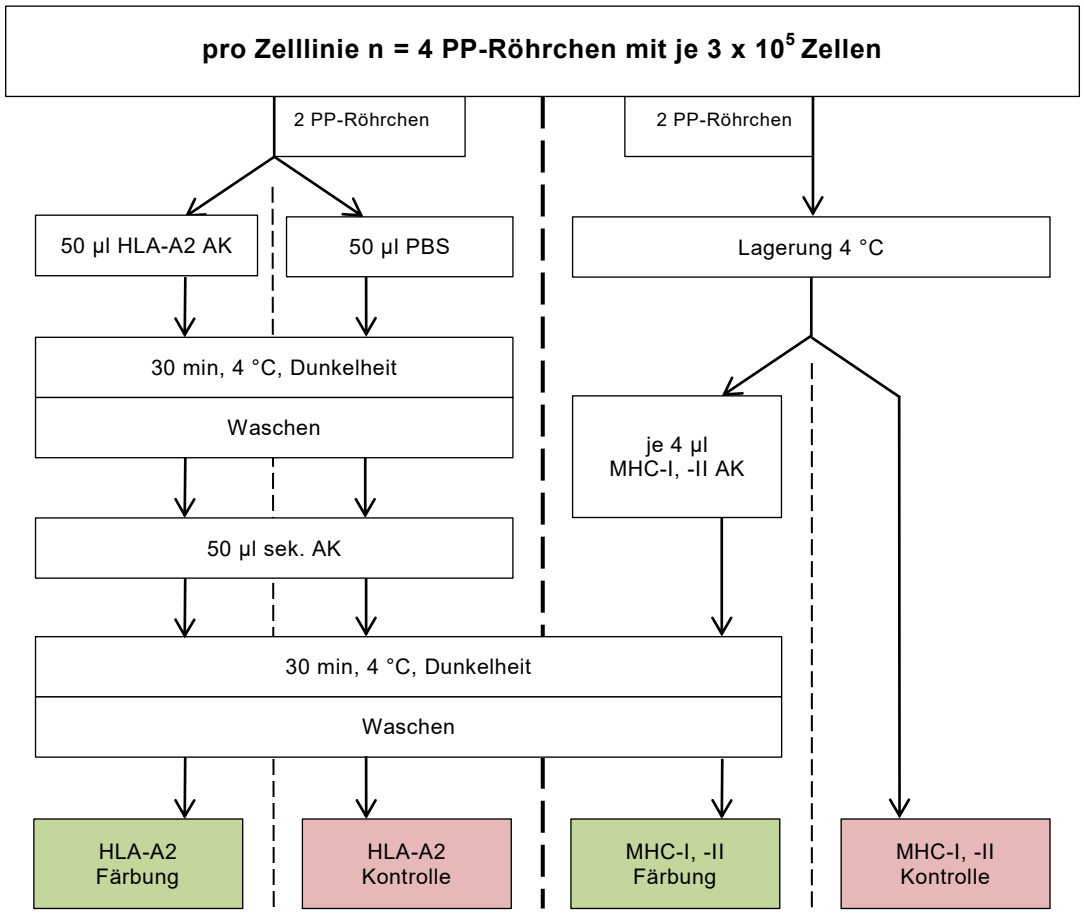

Abbildung 2.2: *Pipettierschema für die extrazelluläre Färbung der immunologischen Oberflächenproteine im Rahmen der Durchflusszytometrie.*

2.2.4.4 Messung und Auswertung

Die Durchführung der Analysen erfolgte am Durchflusszytometer „FACS Calibur™“ nach Herstellerangaben. Anhand des FSC und SSC wurde mit einem *gate* die Population vitaler Tumorzellen (n = 15.000) definiert (Abbildung 2.3-A), deren Fluoreszenz anschließend untersucht wurde. Hierfür diente die Negativkontrolle als Referenz, die üblicherweise eine niedrige Eigenfluoreszenz des betrachteten Farbstoffes (FL1-H) zeigte. Durch das *gate* R2 wurde grundsätzlich der akzeptierte Fluoreszenzbereich von FL1-H definiert (Abbildung 2.3-B). Mit dem Marker M1 (siehe Abbildung 2.3-C) konnte dann die Zunahme der ausgewählten Fluoreszenz durch den Anstieg der in M1 eingeschlossenen Zellen *(gated cells)* ermittelt werden. Als Parameter zur Quantifizierung der Antigenausbildung diente zusammenfassend der Anteil an exprimierenden Zellen *(gated cells)* in Prozent. Alle Analyseschritte der Durchflusszytometrie wurden mit der Software „CellQuestPro“ durchgeführt.

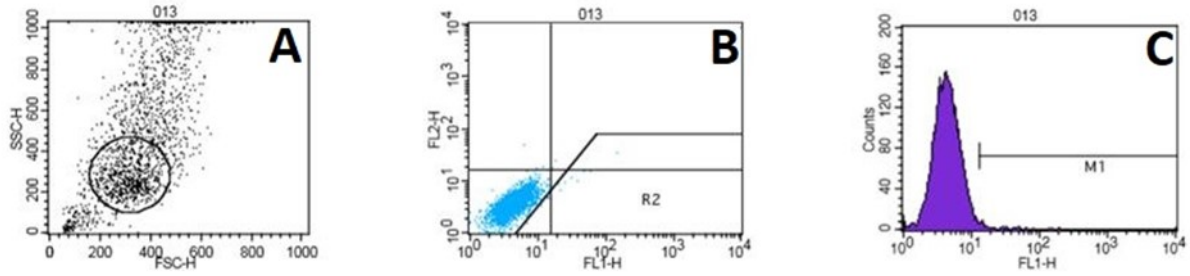

Abbildung 2.3: *Einstellungen und Auswertung der Durchflusszytometrie:* ***A:*** *Zellpopulationscharakterisierung mittels FSC/SSC als Grundlage,* ***B:*** *Zellauswahl nach Fluoreszenzmuster der Kontrolle (Ausschluss mittels R2-gate)* ***C:*** *Festlegung des Kontrollmarkers (M1) der untersuchten Fluoreszenz (FL1-H).*

2.2.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden in der Regel als Mittelwerte dargestellt. Zur Überprüfung möglicher Behandlungseffekte anhand zwei gepaarter, nicht normalverteilter Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Bei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben erfolgte entsprechend die Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Als Signifikanzgrenze galt jeweils ein Wert von $p \leq 0{,}05$.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten der Zelllinien

Die *in vitro* Kultivierung der verwendeten KRK-Zelllinien ist ein zentraler Bestandteil der Versuchsreihen. Schon zu Beginn dieser Analysen konnte das sehr unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien lichtmikroskopisch beobachtet werden. So erschienen die Zelllinien HROC147 T0 M1 und HROC285 T0 M2 bereits früh als ungeeignet für die finalen Behandlungen mit AzaC oder AzaT. Ursächlich dafür war bei HROC147 T0 M1 das in Abbildung 3.1 dargestellte semiadhärente Wachstumsverhalten. HROC285 T0 M2 hatte eine sehr kurze Verdopplungszeit der Tumorzellen, die in einer beinahe 100 %igen, rasenartigen, jedoch instabilen Adhärenz mündete (siehe Abbildung 3.1), die zum Ablösen bei Mediumwechseln oder KV-Assays neigte. Die detaillierten Beobachtungen und Analysen der Zellkulturen von Beginn an konnten eine optimale Auswahl der n = 7 Zelllinien für die finalen Medikamentenbehandlungen sicherstellen und mögliche Fehlerquellen (z.B. bei KV-Färbungen) identifizieren.

Wie in Abbildung 3.2 erkennbar, präsentiert sich der sehr schnell wachsende Vertreter HROC87 T0 M2 als eine adhärente Zelllinie mit morphologisch dichten Kolonien aus einzelnen abgrenzbaren Tumorzellen. Bei HROC50 T1 M5 (Abbildung **3.2**), HROC46 T0 M1 und HROC278Met T2 M2 zeigt sich ein primär flächiger bzw. konfluierender Zellrasen mit scharf begrenztem Umriss. Bei letztgenannter Zelllinie sind die einzelnen Kolonien eher klein mit punktueller Tendenz zur Bildung eines Multilayers. Demgegenüber steht die inhomogene Morphologie von HROC324 (Abbildung 3.3) und HROC69 mit zahlreichen Zellfortsätzen. Wohl durch eine Kontaktinhibition bedingt wird hier lediglich eine geringe Konfluenz (< 50 %) erreicht. HROC18 weist eine sehr geringe Zellteilungsrate auf und das zugehörige Erscheinungsbild, mit homogen flächigem Wachstumsmuster und dezenten Zellausläufern, lässt sich als Mischtyp der o.g. Zelllinien einordnen.

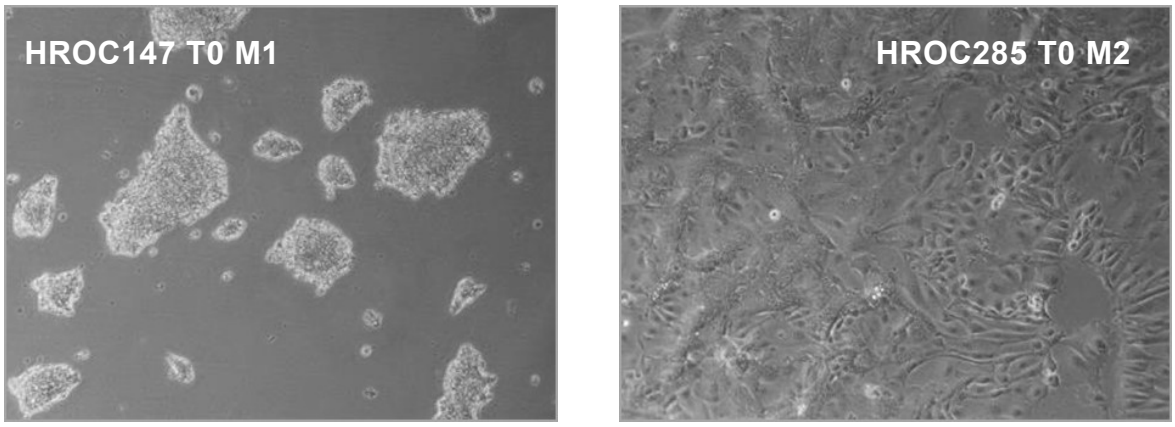

Abbildung 3.1: *Lichtmikroskopische Darstellung (Vergrößerung 100x) des Wachstumsverhaltens der Zelllinien HROC147 T0 M1 und HROC285 T0 M2 (v.l.n.r.).*

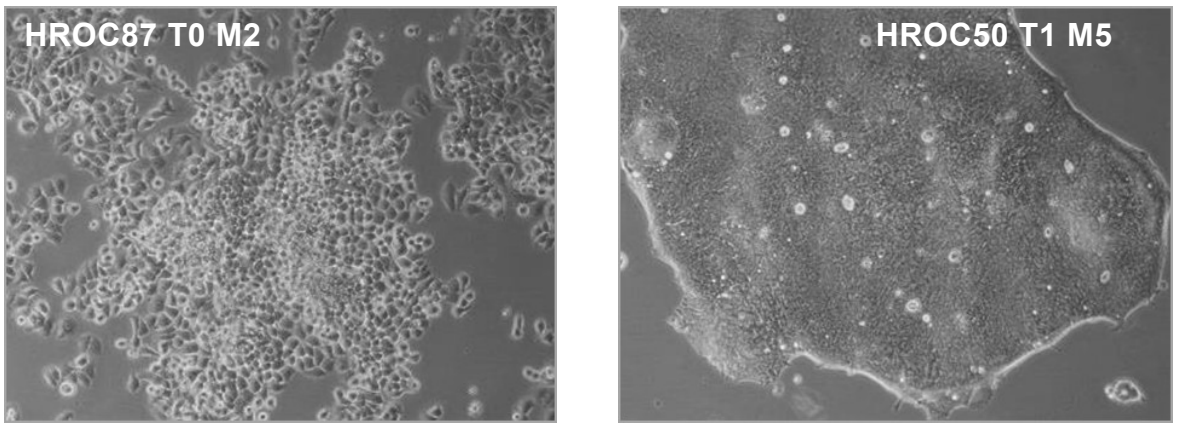

Abbildung 3.2: *Lichtmikroskopische Darstellung (Vergrößerung 100x) des Wachstumsverhaltens der Zelllinien HROC87 T0 M2 und HROC50 T1 M5 (v.l.n.r.).*

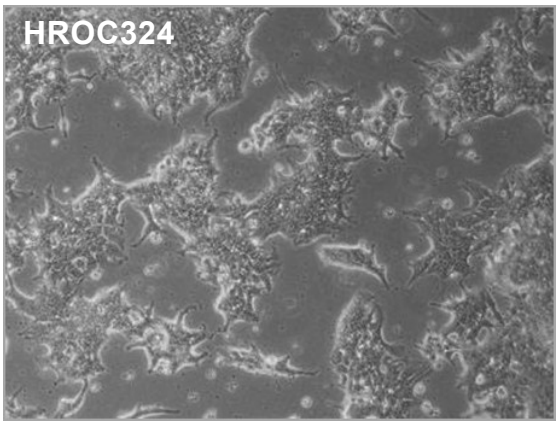

Abbildung 3.3: *Lichtmikroskopische Darstellung (Vergrößerung 100x) des Wachstumsverhaltens der Zelllinie HROC324.*

3.2 Basale HERV-H Expression

3.2.1 Untersuchung auf RNA-Ebene

3.2.1.1 Screening

Den ersten Bestandteil des Screenings stellte die Analyse der basalen HERV-H Expression mittels n = 7 spezifischen Primern dar (Pérot et al., 2015). Ausgehend von vorherigen Expressionsuntersuchungen der entsprechenden Loci in der AG MOI konnten aus der erweiterten KRK-Tumorbank (n = 52 Zelllinien) nun n = 26 Zelllinien vorausgewählt werden, die in etwa zu gleichen Teilen aus niedrig, mittel und hoch exprimierenden Vertretern bestehen sollten.

Die durch die AG MOI vorbereiteten Zellpellets wurden entsprechend aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.2.2), sodass die qRT-PCR mit anschließender Bestimmung der Primer-spezifischen RE erfolgen konnte. Die ermittelten Werte (siehe Tabelle A.2 im Anhang) sind in Abbildung 3.4 veranschaulicht. Dabei liegen X00041_h_gag und 500502_h_L3U3 in den meisten Zelllinien (24/26) exprimiert vor (RE > 0,0). Außerdem weist der X-chromosomale Genlocus am häufigsten (10/26) besonders hohe Expressionswerte (RE > 1,0) auf. Die drei größten Werte mit RE = 41,86 (HROC239 T0 M1), RE = 13,24 (HROC257 T0 M1) und RE = 9,06 (HROC87 T0 M2) zeigt ebenso X00041_h_gag. Der 2000045_h_gag Locus wird zwar häufig exprimiert (21/26), jedoch bis auf eine Ausnahme nur mit geringer Ausprägung (RE < 1,0). Die verbleibenden HERV-H Loci zeigen eine insgesamt niedrige RE. Auffällig ist HROC278Met T2 M2, die als einzige Zelllinie für alle n = 5 Loci keine Expression (RE = 0,0) aufweist. Demgegenüber stehen besonders stark exprimierende Zelllinien (HROC87 T0 M2, HROC147 T0 M1, HROC147Met, HROC239 T0 M1, HROC257 T0 M1, HROC313Met1 T0 M2). Basierend auf den qRT-PCR Ergebnissen und Kontrollgelelektrophoresen wurden, auch als Basis für alle folgenden Analysen, hier die Schmelztemperaturen (siehe Kapitel 2.2.2.4) der n = 7 HERV-H Primer für die vorherrschenden Versuchsbedingungen und Gerätevoraussetzungen der qRT-PCR definiert (siehe Tabelle A.3 im Anhang). Die Überprüfung der Amplifikatlängen erfolgte weiterhin mittels Gelelektrophorese.

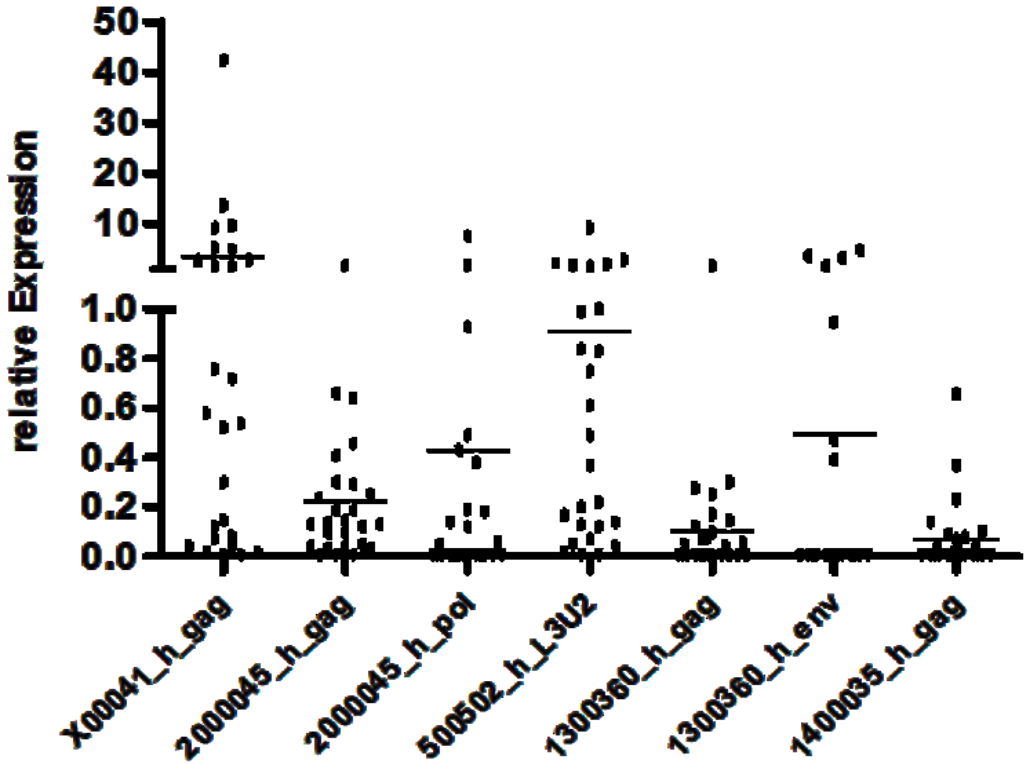

Abbildung 3.4: *RE der n = 7 HERV-H spezifischen Loci (siehe x-Achse) aller n = 26 Zelllinien im Rahmen der Screeninguntersuchung. Darstellung des entsprechenden Mittelwertes der RE für jeden Locus.*

3.2.1.2 Klassifikation der Zelllinien

Final wurden n = 24 Zelllinien ausgewählt, die sich mit je n = 8 Vertretern zu gleichen Teilen in drei Expressionsgruppen (niedrig, mittel, hoch) einordnen ließen (siehe Tabelle 3.1). Als Basis für die Klassifikation diente insgesamt eine Zusammenschau der in der AG MOI zuvor ermittelten Werte und den Ergebnissen der aktuellen Analysen. Durch ein unzureichendes Wachstumsverhalten einiger Zelllinien oder hohen SD zwischen den beiden Messungen wurde für weitere Untersuchungen dann auf die zuverlässigsten Vertreter zurückgegriffen. Des Weiteren wurden die Zelllinien HROC69 und HROC69 T0 M2 ausgewählt, die dem interessanten klinischen Fall eines unter AzaT entstandenen KRK entstammen (Kuehn et al., 2016). Aufgrund ihrer Expressionswerte wurden sie zur besseren Visualisierung der mittleren Expressionsgruppe zugeordnet. In Abbildung 3.5 sind zusammenfassend die Expressionswerte für alle n = 7 HERV-H Loci in den n = 24 Zelllinien nach Gruppen sortiert grafisch dargestellt.

Tabelle 3.1: *Klassifikation von n = 24 Zelllinien des HERV-H RNA-Screenings (HROC69 und HROC69 T0 M2 fehlen) nach Grad der RE. Farbliche Gruppenzuordnung: orange (niedrige Expression), blau (mittlere Expression) und grün (hohe Expression).*

Hohe Expression	Mittlere Expression	Niedrige Expression
HROC173	HROC43	HROBMC01
HROC18	HROC40	HROC24
HROC313Met1 T0 M2	HROC50 T1 M5	HROC296
HROC87 T0 M2	HROC24 T1 M1	HROC364
HROC147 T0 M1	HROC147Met	HROC309
HROC46 T0 M1	HROC285 T0 M2	HROC59 T1 M1
HROC131 T0 M3	HROC324	HROC239 T0 M1
HROC257 T0 M1	HROC278 T0 M1	HROC278Met T2 M2

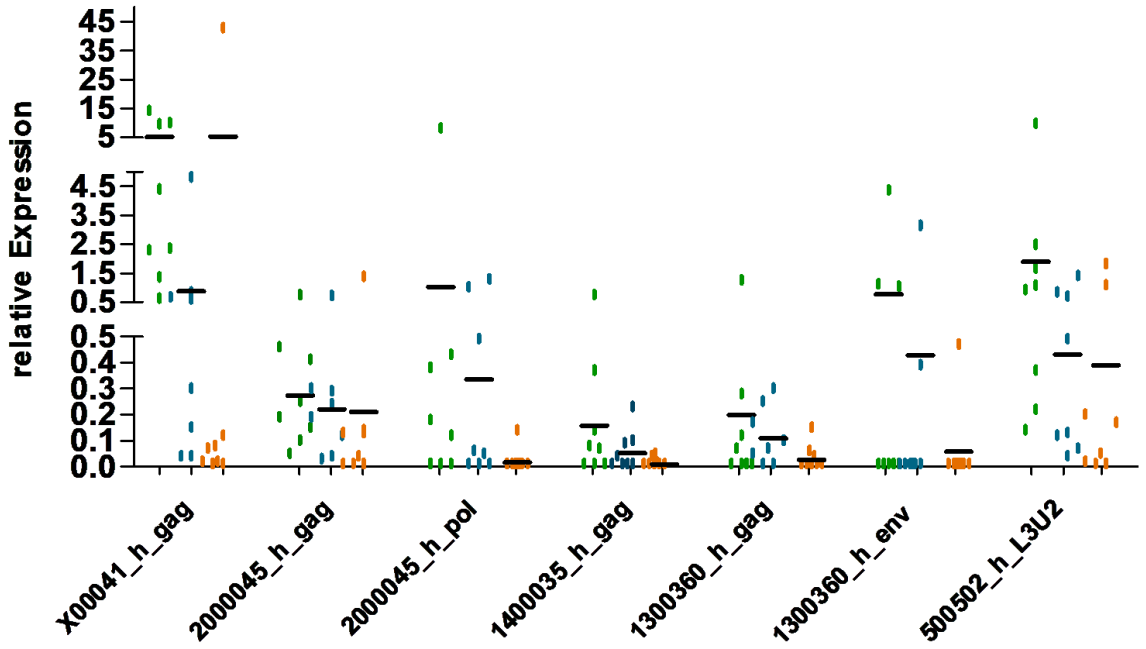

Abbildung 3.5: *Nach Gruppenzugehörigkeit sortierte RE der n = 7 für HERV-H spezifischen Loci (siehe x-Achse) in den Zelllinien des initialen RNA-Screenings (n = 24, es fehlen HROC69 und HROC69 T0 M2). Farbliche Gruppenzuordnung: orange (niedrige Expression), blau (mittlere Expression) und grün (hohe Expression). Darstellung des entsprechenden Mittelwertes der RE für jede Gruppe eines Primers.*

3.2.2 Analyse der Proteinexpression

Die durchflusszytometrische Analyse der HERV-H Proteinexpression erfolgte an n = 5 Zelllinien pro Expressionsgruppe (+HROC69).

Folgende n = 6 AK-Ansätze (siehe Kapitel 2.2.4.2) wurden verwendet:

- Anti-gag-H Klone: 1B3H7, 1D7D11, 2H2D6, 14H11G1
- Irrelevanter Kontroll-AK: anti-His 2G2B3
- Kontrollfärbung ohne primären AK

Der prozentuale Anteil der markierten Zellen, als Parameter für die HERV-H Proteinausbildung, ist für alle Messungen in der Tabelle A.4 im Anhang dargestellt. Mit 1,04 ± 0,14 % (kein sek. AK) und 2,25 ± 2,59 % (anti-His AK) zeigten die Negativkontrollen nur eine geringe Hintergrundexpression. Dabei präsentierten die eng gruppierten Werte 18,68 ± 15,43 % (1B3H7), 18,77 ± 17,37 % (2H2D6) und 19,37 ± 18,08 % (1D7D11) für drei der untersuchten AK ebenso nur geringe gag-H Expressionen. 14H11G1 wies jedoch sehr gleichmäßige Ergebnisse und mit durchschnittlich 43,92 ± 17,29 % markierten Zellen den stärksten Proteinnachweis auf. Aufgrund dieser Ergebnisse, die mit denen der Originalarbeit (Mullins et al., 2016) einhergehen, wurden alle weiteren Analysen auf den 14H11G1 AK ausgerichtet.

Im Rahmen des anti-gag-H Klonscreens wurden mindestens n = 2 entsprechende Messungen durchgeführt. Geordnet nach Expressionsgruppen ist in den Abbildungen 3.6-3.8 für jede Zelllinie der Mittelwert des prozentualen Anteils der durch 14H11G1 markierten Zellen mit SD grafisch dargestellt. Die niedrig exprimierende Gruppe zeigt sich sehr heterogen mit einer großen Spannweite der Ergebnisse zwischen 20,44 ± 2,18 % (HROC296) und 84,06 ± 4,09 % (HROC278Met T2 M2). Somit sind, von allen n = 16 Zelllinien, sowohl die höchsten, als auch die niedrigsten Werte der 14H11G1 Markierung in dieser Gruppierung vertreten. Die mittlere Gruppe besitzt einen moderaten Wertebereich von 22,82 ± 11,15 % (HROC278 T0 M1) bis 49,53 ± 7,38 % (HROC324). Die dritte Gruppe (hohe RE) zeigt eine gleichmäßig starke Expression mit engem Spektrum zwischen 49,92 ± 3,61 % (HROC87 T0 M2) und 67,32 ± 9,23 % (HROC147 T0 M1).
Neben den grundsätzlich niedrigen Ergebnisabweichungen innerhalb der Zelllinien lassen sich jedoch vereinzelt für HROC309 (53,18 ± 15,21 %), HROC278 T0 M1 (22,82 ± 11,12 %), HROC285 T0 M2 (40,51 ± 12,31 %) und HROC18 (58,56 ± 22,07 %) hohe SD erkennen.

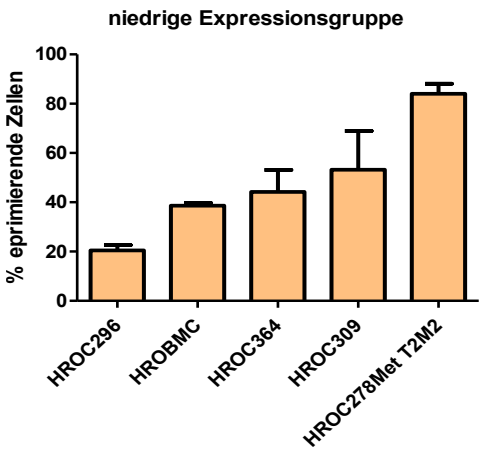

Abbildung 3.6: *Mittelwert und SD des prozentualen Anteils der durch den 14H11G1 AK markierten Zellen (niedrig exprimierende Gruppe). Messung von n = 5 Vertretern (siehe x-Achse).*

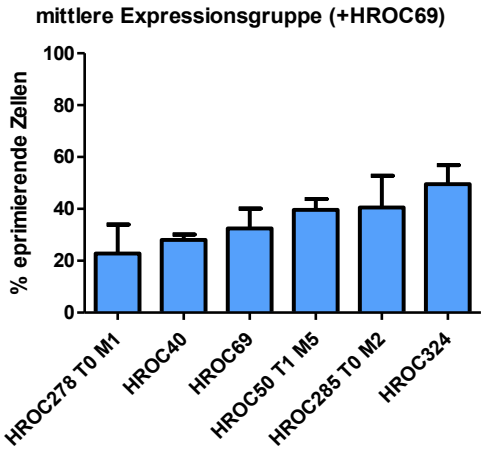

Abbildung 3.7: *Mittelwert und SD des prozentualen Anteils der durch den 14H11G1 AK markierten Zellen (mittel exprimierende Gruppe +HROC69). Messung von n = 6 Vertretern (siehe x-Achse).*

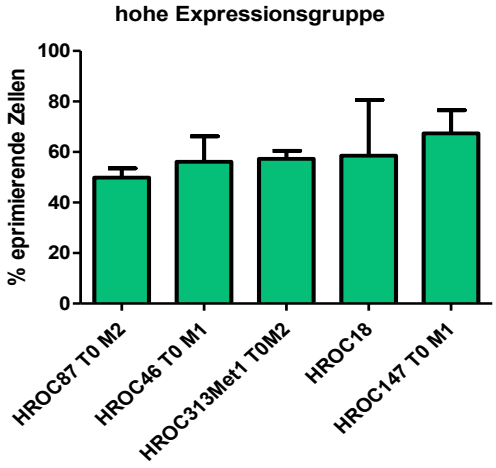

Abbildung 3.8: *Mittelwert und SD des prozentualen Anteils der durch den 14H11G1 AK markierten Zellen (hoch exprimierende Gruppe). Messung von n = 5 Vertretern (siehe x-Achse).*

In den Abbildungen 3.9 – 3.11 ist für alle n = 16 Zelllinien je ein Histogramm zur exemplarischen Visualisierung der 14H11G1 Expression dargestellt. Die Negativkontrollen (hell- und dunkelgrau) besitzen größtenteils einen morphologisch gleichförmigen Kurvenverlauf mit einer geringen FITC-Signalstärke ($< 10^1$). Die HERV-H AK-markierten Zellen (hellgrün) erreichen höhere FITC-Signalstärken (max. 10^2). Die Kurven der Zelllinien zeigen sich zweigipflig (HROBMC01, HROC87 T0 M2, HROC296, HROC309, HROC313Met1 T0 M2, HROC364, HROC324), flach (HROC50 T1 M5, HROC69) oder parabelförmig. Letztere sind morphologisch spitz (HROC46 T0 M1, HROC147 T0 M1, HROC278 T0 M1, HROC278Met T2 M2) oder abgerundet (HROC18, HROC40, HROC285 T0 M2).

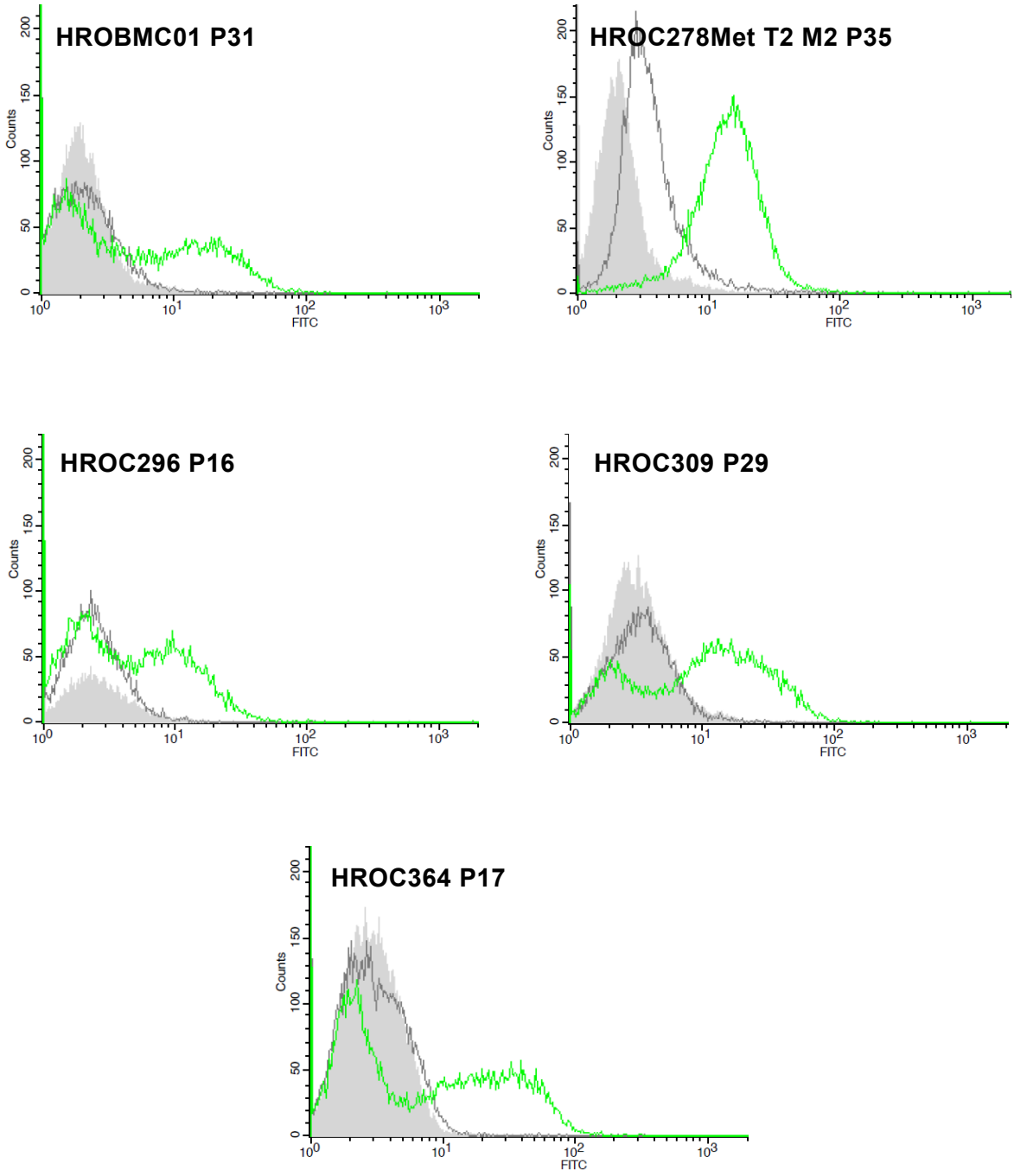

Abbildung 3.9: *Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung (unter Angabe der Passage) des 14H11G1 AK (grün) gegenüber dem irrelevanten Kontrollantikörper anti-His 2G2B3 (hellgrau) und der zweiten Kontrolle ohne sek. AK (dunkelgrau) für die niedrig exprimierenden Zelllinien (HROBMC01, HROC278Met T2 M2, HROC296, HROC309, HROC364). Gegenüberstellung der Zellanzahl (counts) auf der Y-Achse und der FITC-Fluoreszenzstärke des 14H11G1 AK logarithmisch skaliert (x-Achse).*

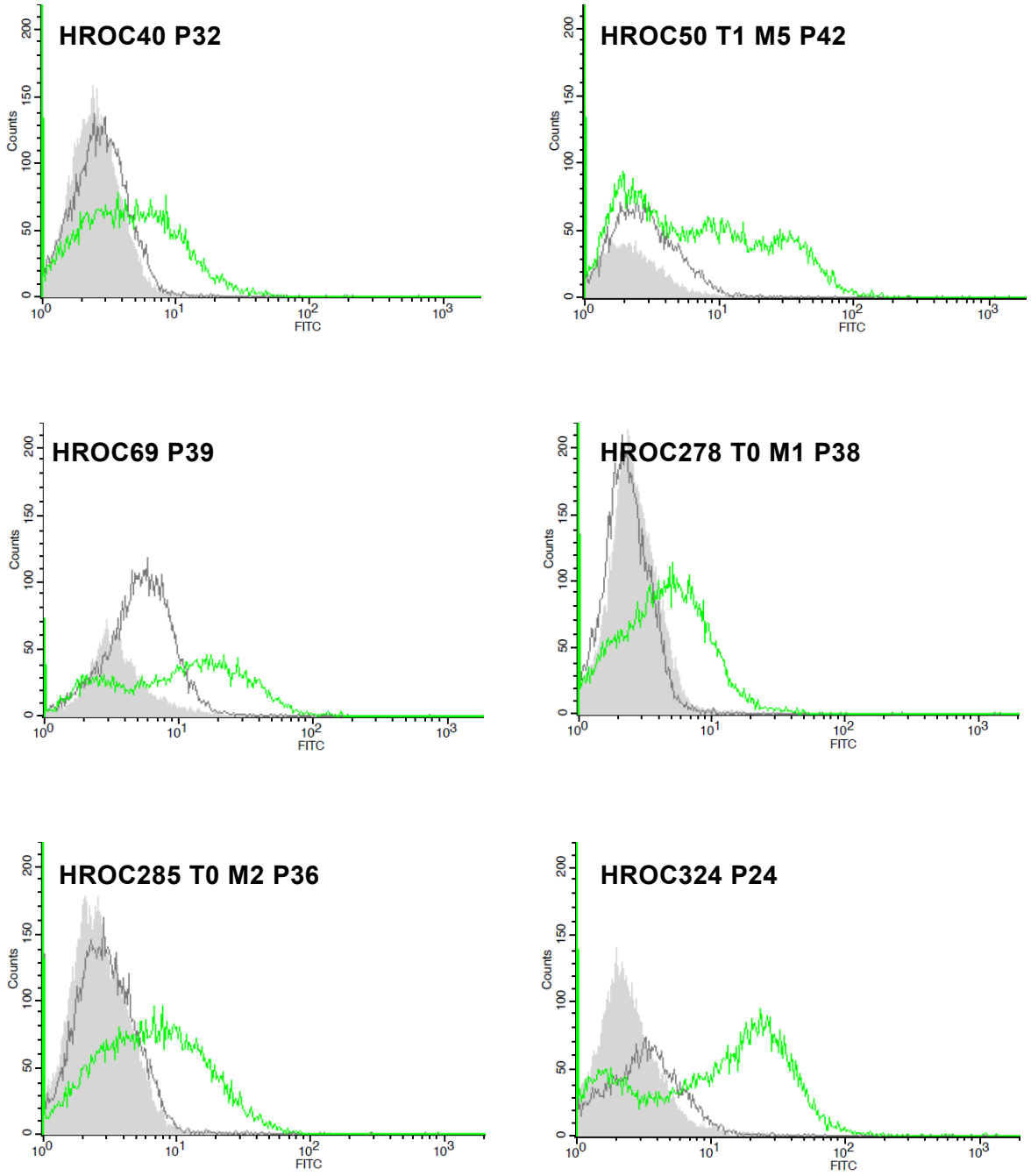

Abbildung 3.10: *Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung (unter Angabe der Passage) des 14H11G1 AK (grün) gegenüber dem irrelevanten Kontrollantikörper anti-His 2G2B3 (hellgrau) und der zweiten Kontrolle ohne sek. AK (dunkelgrau) für die mittel exprimierenden Zelllinien (HROC40, HROC50 T1 M5, HROC69, HROC278 T0 M1, HROC285 T0 M2, HROC324). Gegenüberstellung der Zellanzahl (counts) auf der Y-Achse und der FITC-Fluoreszenzstärke des 14H11G1 AK logarithmisch skaliert (x-Achse).*

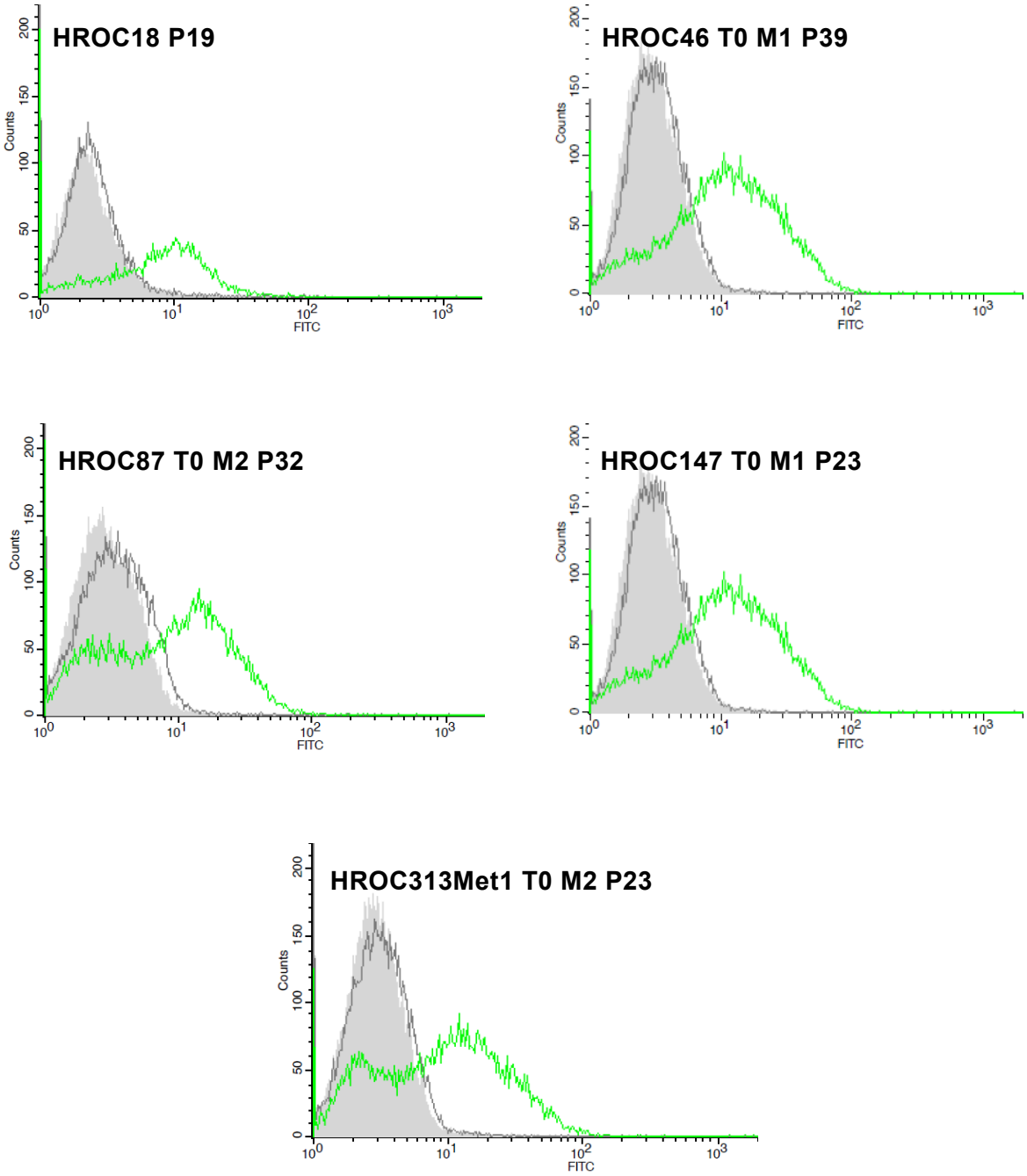

Abbildung 3.11: *Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung (unter Angabe der Passage) des 14H11G1 AK (grün) gegenüber dem irrelevanten Kontrollantikörper anti-His 2G2B3 (hellgrau) und der zweiten Kontrolle ohne sek. AK (dunkelgrau) für die hoch exprimierenden Zelllinien (HROC18, HROC46 T0 M1, HROC87 T0 M2, HROC147 T0 M1, HROC313Met1 T0 M2). Gegenüberstellung der Zellanzahl (counts) auf der Y-Achse und der FITC-Fluoreszenzstärke des 14H11G1 AK logarithmisch skaliert (x-Achse).*

3.2.3 Expressionsvergleich RNA vs. Protein

Exemplarisch für die generelle HERV-H Proteinexpression wurden nun die Werte des 14H11G1 AK für alle Mitglieder einer Gruppe gemittelt. Zur Verdeutlichung wurden ihnen die ebenso gemittelten RNA-Expressionswerte dieser n = 16 Zelllinien, stellvertretend mit dem stärksten Locus X00041_h_gag, gegenübergestellt. Es lässt sich in Abbildung 3.12 eine signifikante (p = 0,0017) Senkung des prozentualen Anteils der durch 14H11G1 markierten Zellen von der hoch (57,85 ± 6,26 %), zur mittel (35,80 ± 9,55 %) exprimierenden Gruppe feststellen. Demgegenüber stehen die erhöhten Werte der Gruppierung mit niedriger Ausprägung (48,10 ± 23,39 %), deren Mittelwert zusätzlich eine hohe SD besitzt. Als Ausreißer dieser Gruppe zeigt sich HROC278Met T2 M2 mit der überproportional hohen Anzahl (84,06 ± 4,09 %) an Zellen mit 14H11G1 Markierung.

Somit lässt sich zusammenfassend keine signifikante Korrelation zwischen der HERV-H Expression auf RNA- und Proteinebene finden. Basierend auf der signifikanten 14H11G1 Expressionsverringerung von der hoch zur mittel exprimierenden Gruppe kann hier aber durchaus von einem, der RNA-Klassifikation folgenden, Trend gesprochen werden.

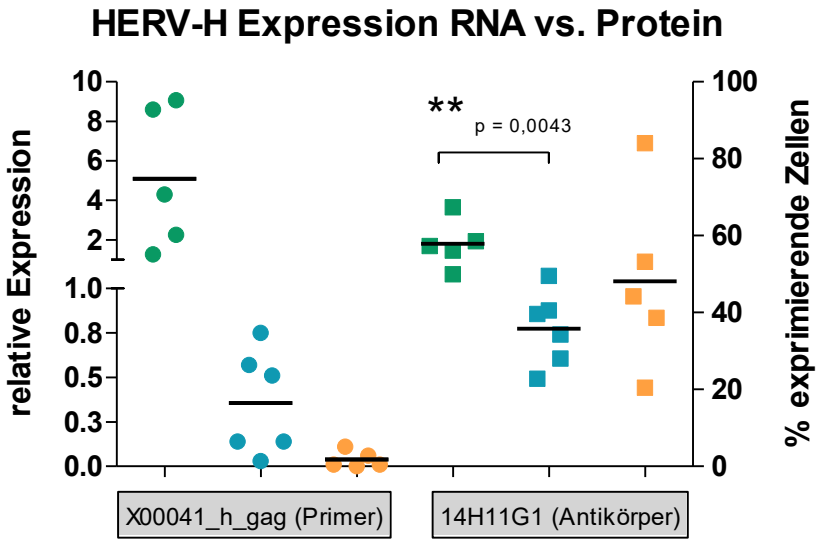

Abbildung 3.12: *Vergleich HERV-H Expression auf RNA- (RE des X00041_h_gag Locus) und Proteinebene (prozentualer Anteil der durch 14H11G1 markierten Zellen). Die Zelllinienauswahl erfolgte auf Basis der Proteinexpressionsmessung und umfasst Vertreter mit niedriger RE (HROBMC01, HROC278Met T2 M2, HROC296, HROC309, HROC364), mittlerer RE (HROC40, HROC50 T1 M5, HROC69, HROC278 T0 M1, HROC285 T0 M2, HROC324) und hoher RE (HROC18, HROC46 T0 M1, HROC87 T0 M2, HROC147 T0 M1, HROC313Met1 T0 M2). Farbliche Gruppenzuordnung: orange (niedrige Expression), blau (mittlere Expression) und grün (hohe Expression). Darstellung des entsprechenden Mittelwertes der gesamten X00041_h_gag RE bzw. des gesamten prozentualen Anteils der durch 14H11G1 markierten Zellen für jede Expressionsgruppe.*

3.3 IC_{50}-Bestimmung

3.3.1 Allgemeine Durchführung

Um final in den KRK-Zelllinien eine durch Hypomethylierung verursachte HERV-H Überexpression zu induzieren musste ein Gleichgewicht zwischen maximaler Wirkstoffkonzentration und noch tolerierbarer Zytotoxizität erreicht werden. Die IC_{50} wird als die höchste angestrebte Wirkstoffkonzentration in der Zellkultur angesehen und bildete die Basis für alle weiteren Behandlungsansätze. Die Bestimmung dieses Wertes auf einer 96-Well-Platte erfolgte geringstenfalls zweimalig mit einer Behandlungsdauer über 2 x 72 h. Die Analysen fanden dabei mindestens an den n = 7 ausgewählten Zelllinien (HROC309, HROC278Met T2 M2, HROC50 T1 M5, HROC324, HROC69, HROC18, HROC87 T0 M2) für die finalen Therapieansätze statt.

3.3.2 Azathioprin

Die IC_{50}-Bestimmung für AzaT erfolgte mit n = 6 AzaT-Konzentrationen, sowie den Tot- und Lebendkontrollen (siehe Kapitel 2.2.3.1). In den Abbildungen 3.13 – 3.16 sind die gemittelten und auf die Lebendkontrolle normierten Überlebenskurven der hier untersuchten n = 10 Zelllinien grafisch dargestellt. Es zeigt sich insgesamt ein sigmoidaler Verlauf. Nach dem waagerechten Kurvenbeginn geht der Graph in einen Vitalitätsabfall ab c ≥ 1,2 µM über. Es kann dabei zwischen einem eher steilen Abfall (HROC309, HROC278Met T2 M2, HROC18, HROC50 T1 M5, HROC324, HROC69, HROC46 T0 M1) und einem abgeflachten, tendenziell linearen, Vitalitätsverlust (HROC313Met1 T0 M2, HROC147 T0 M1, HROC87 T0 M2) unterschieden werden. Innerhalb der Zelllinien liegen größtenteils gleichförmig verlaufende Graphen vor, als Ausnahme zeigen sich jedoch die zwei Kurven von HROC324 mit deutlichen Abweichungen (hier nicht dargestellt). Zusätzlich sind leichte Vitalitätssteigerungen in den geringeren Konzentrationen (≤ 1,2 µM) bei bestimmten Zelllinien (HROC309, HROC278Met T2 M2, HROC69, HROC313Met1 T0 M2) zu verzeichnen.

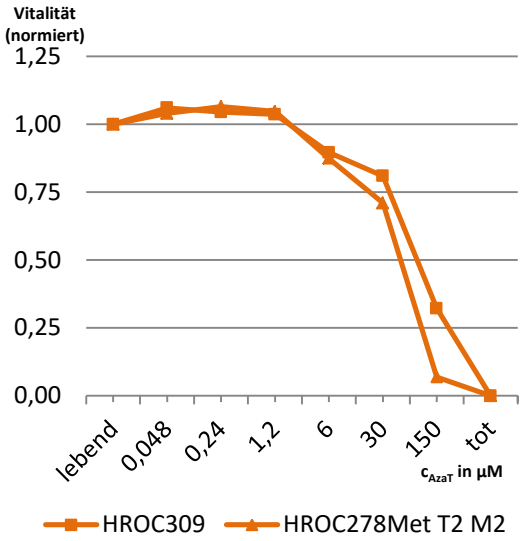

Abbildung 3.13: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) der niedrigen Expressionsgruppe (HROC309, HROC278Met T2 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,048; 0,24; 1,20; 6,00; 30,00; 150,00 µM.*

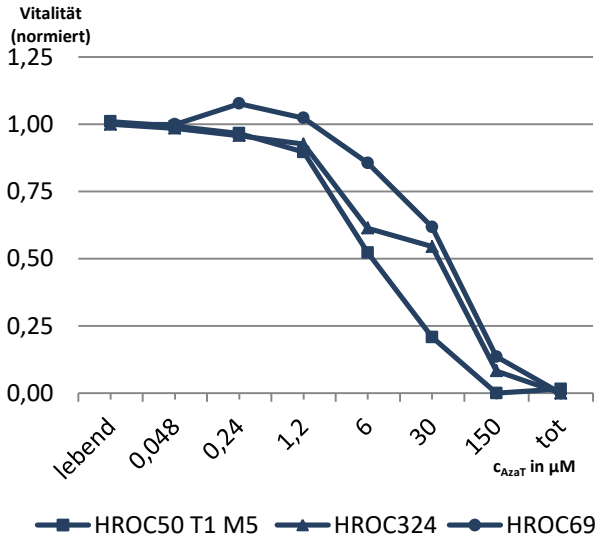

Abbildung 3.14: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) der mittleren Expressionsgruppe (HROC50 T1 M5, HROC324, HROC69) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,048; 0,24; 1,20; 6,00; 30,00; 150,00 µM.*

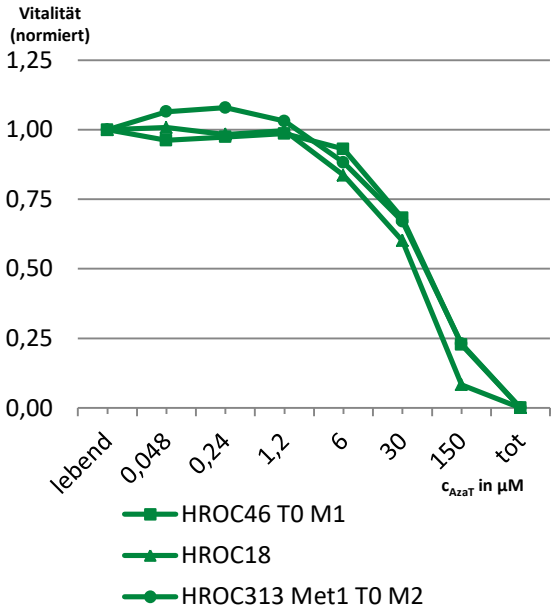

Abbildung 3.15: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC46 T0 M1, HROC18, HROC313Met1 T0 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,048; 0,24; 1,20; 6,00; 30,00; 150,00 µM.*

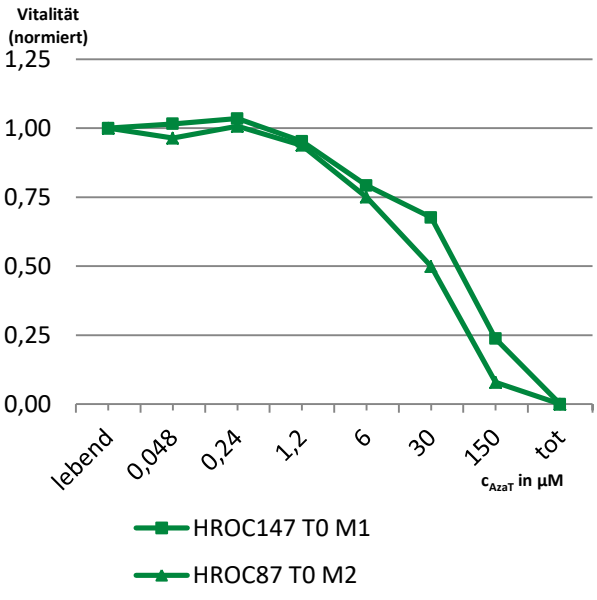

Abbildung 3.16: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC147 T0 M1, HROC87 T0 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,048; 0,24; 1,20; 6,00; 30,00; 150,00 µM.*

Die aus diesen Kurven ermittelten IC_{50}-Werte befinden sich zwischen 20,00 ± 11,13 µM (HROC50 T1 M5) und maximal 94,68 ± 10,23 µM (HROC309). Diese Spannweite wird sowohl in der hoch, als auch in der niedrig exprimierenden Gruppe annähernd ausgeschöpft. Die Zelllinien der Gruppe mit mittlerer RE zeigen niedrige IC_{50}-Ausprägungen zwischen 20,00 ± 11,13 µM (HROC50 T1 M5) und 34,65 ± 10,54 µM (HROC324). Des Weiteren sind, bis auf HROC46 T0 M1, durchweg hohe SD vorhanden. Besonders groß sind diese bei HROC313Met1 T0 M2 (79,08 ± 52,80 µM), HROC278Met T2 M2 (35,86 ± 28,84 µM) und HROC87 T0 M2 (36,89 ± 27,15 µM).

Insgesamt lässt sich, wie in Abbildung 3.17 erkennbar, keine Korrelation zwischen der auf RNA-Ebene vorgenommenen Klassifikation und den IC_{50}-Ergebnissen feststellen. Auch die Zelllinie HROC69, die aus einem mit AzaT vorbehandelten Patienten entstammt, zeigt mit 52,13 ± 19,86 µM einen durchschnittlichen Wert und somit keine Anzeichen für eine veränderte Sensibilität gegenüber AzaT.

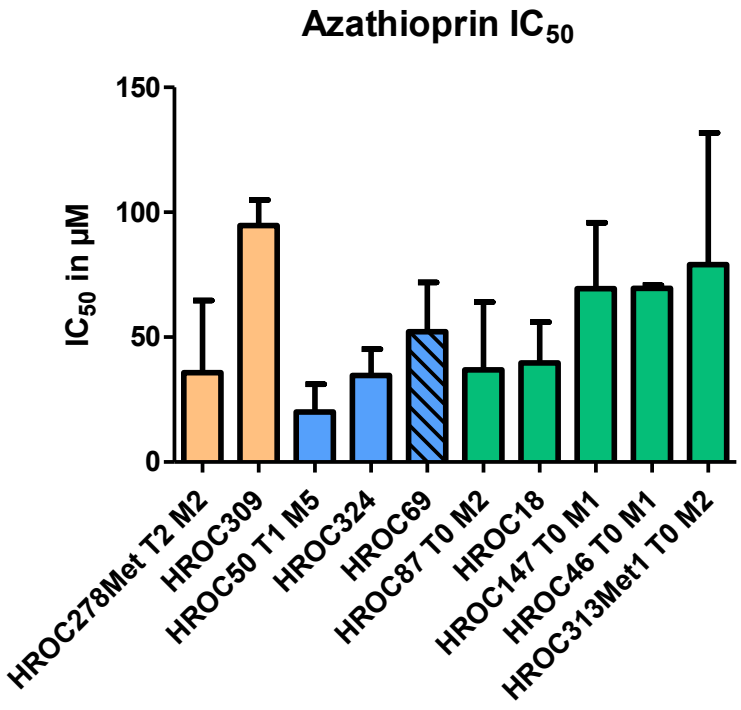

Abbildung 3.17: *IC_{50}-Werte (gemittelt mit SD) der n = 10 untersuchten Zelllinien (siehe x-Achse) nach 2 x 72 h AzaT-Behandlung. Farbliche Gruppenzuordnung: orange (niedrige Expression), blau (mittlere Expression) und grün (hohe Expression).*

3.3.3 Azacitidin

Die IC_{50}-Bestimmung für AzaC erfolgte mit n = 6 Medikamentenkonzentrationen, sowie den zusätzlichen Tot- und Lebendkontrollen (siehe Kapitel 2.2.3.1). In den Abbildungen 3.18 – 3.22 sind die gemittelten und auf die Lebendkontrolle normierten Überlebenskurven von n = 12 untersuchten Zelllinien grafisch dargestellt. Es zeigt sich initial eine Schulterform, die mit dem starken Vitalitätsabfall (c > 4,5 µM) in einen exponentiellen Verlauf übergeht. Teilweise kann ein abgeflachter und tendenziell linearer Graph (HROC46 T0 M1, HROC364) beobachtet werden. Grundsätzlich ist zwischen den einzelnen Passagen der identischen Zelllinien ein morphologisch gleichförmiger Verlauf zu beobachten. Dies ist insbesondere bei HROC278Met T2 M2, HROC324, HROC147 T0 M1, HROC313Met1 T0 M2 und HROC87 T0 M2 der Fall. Die Graphen der letzten beiden Zelllinien sind in Abbildung 3.23 exemplarisch dargestellt. Stärkere Abweichungen gibt es bei HROC285 T0 M2 und HROC364, wobei diese auf eine erhöhte Vitalität einer der beiden Passagen bei geringen Konzentrationen (< 4,5 µM) zurückzuführen sind. In dem gleichen Konzentrationsbereich zeigt HROC18 P18 (gegenüber P25 und P26) einen Vitalitätsverlust. In den höheren Konzentrationsbereichen liegt jedoch wieder ein annähernd gleichförmiger Kurvenverlauf dieser Zelllinie vor (hier nicht dargestellt).

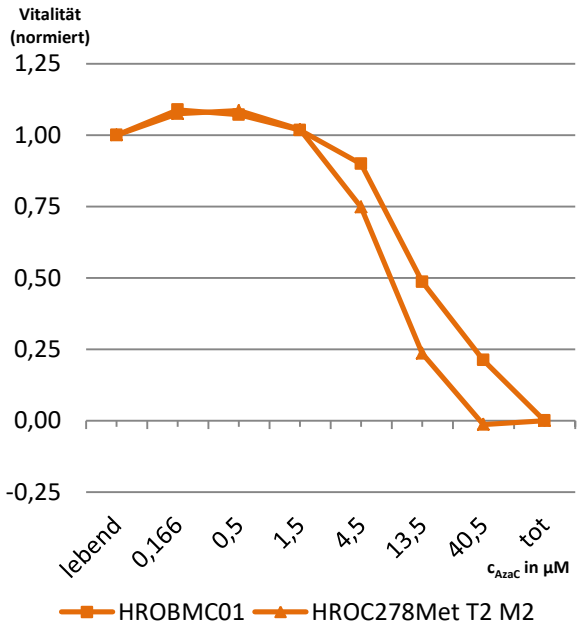

***Abbildung 3.18**: Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der niedrigen Expressionsgruppe (HROBMC01, HROC278Met T2 M2) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

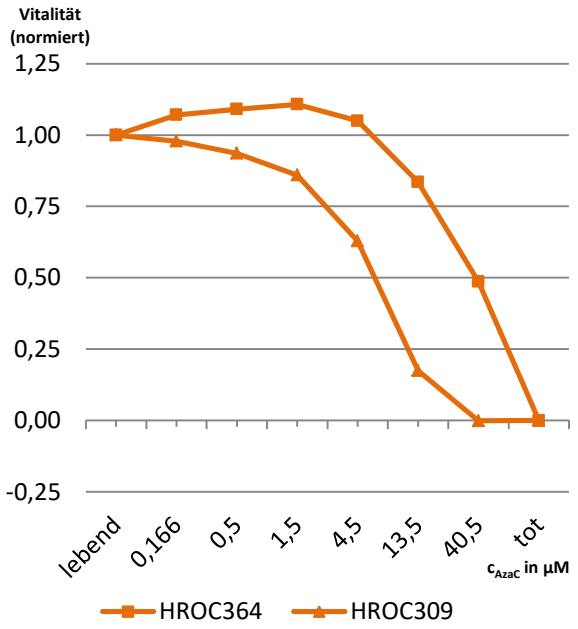

***Abbildung 3.19:** Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der niedrigen Expressionsgruppe (HROC364, HROC309) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

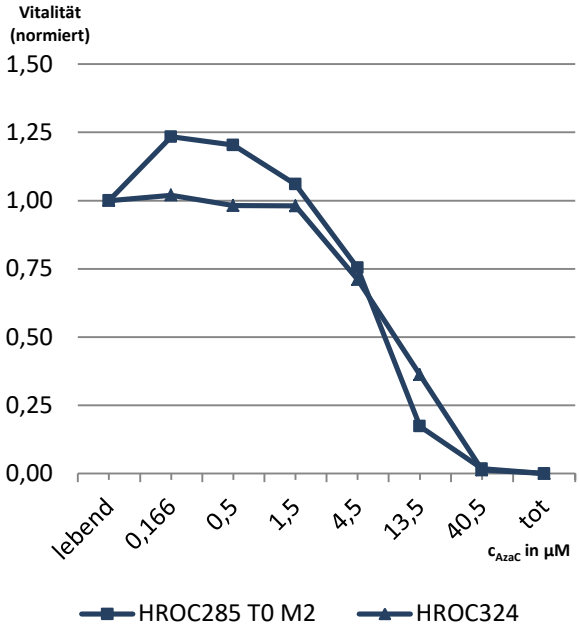

Abbildung 3.20: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der mittleren Expressionsgruppe (HROC285 T0 M2, HROC324) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

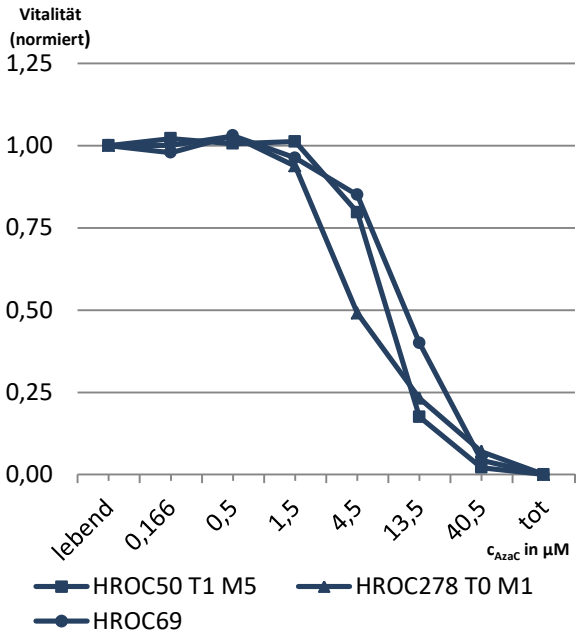

Abbildung 3.21: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der mittleren Expressionsgruppe (HROC50 T1 M5, HROC278 T0 M1, HROC69) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

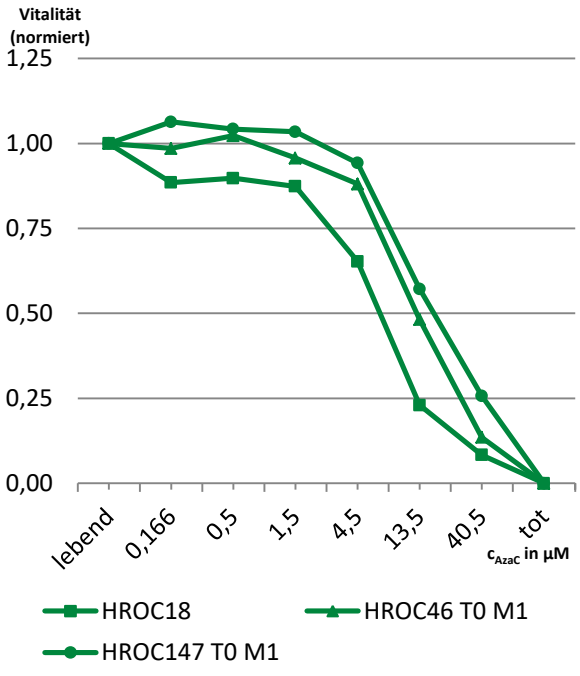

Abbildung 3.22: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven (gemittelt) für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC18, HROC46 T0 M1, HROC147 T0 M1) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

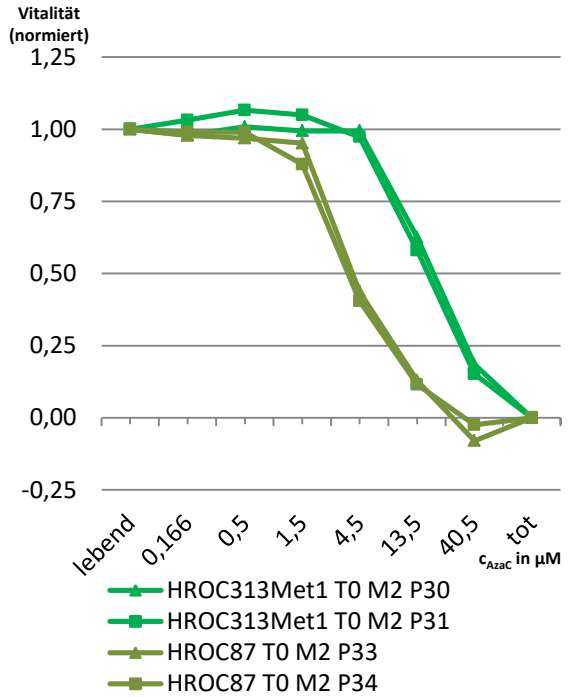

Abbildung 3.23: *Auf 1,0 normierte Überlebenskurven für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC313Met1 T0 M2, HROC87 T0 M2) mit je n = 2 Passagen nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h mit c = 0,166; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 µM.*

Die aus diesen Kurven ermittelten IC_{50}-Werte befinden sich zwischen 3,95 ± 0,07 µM (HROC87 T0 M2) und 39,20 ± 3,96 µM (HROC364) und sind in der Abbildung 3.24. dargestellt. So ist hier die IC_{50}-Spannweite mit 35,25 µM deutlich geringer als bei AzaT (74,68 µM). In der niedrig exprimierenden Gruppe zeigt neben HROC364 auch HROBMC01 (18,05 ± 0,78 µM) eine hohe IC_{50}, während für die verbleibenden zwei Vertreter (HROC309, HROC278Met T2 M2) geringe Konzentrationen ermittelt wurden. Die Gruppe der mittelstark exprimierenden Zelllinien umfasst im Bereich der IC_{50} eine geringe Spannweite (2,75 µM) zwischen 6,9 ± 0,28 µM (HROC50 T1 M5) und 9,65 ± 2,33 µM (HROC69). In der Gruppe mit hoher RE besitzen, anders als HROC87 T0 M2 (IC_{50}-Minimum), die restlichen n = 4 Vertreter erhöhte IC_{50}-Werte zwischen 12,67 ± 3,75 µM (HROC18) und 20,85 ± 2,76 µM (HROC147 T0 M1).

Insgesamt liegt auch hier keine Korrelation zwischen den IC_{50}-Werten und der HERV-H Klassifikation auf RNA-Ebene vor. Im Gegensatz zur Bestimmung der IC_{50} für AzaT liegen hier insgesamt geringe SD vor. Eine Ausnahme bildet jedoch HROC278 T0 M1 (7,77 ± 4,95 µM).

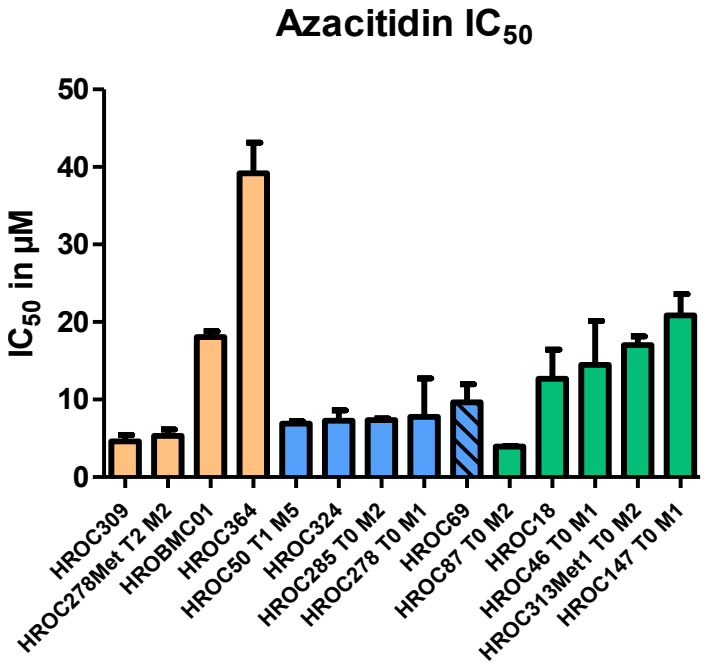

Abbildung 3.24: *IC_{50}-Werte (gemittelt mit SD) der n = 14 untersuchten Zelllinien (siehe x-Achse) nach 2 x 72 h AzaC-Behandlung. Farbliche Gruppenzuordnung: orange (niedrige Expression), blau (mittlere Expression) und grün (hohe Expression).*

3.4 Finale Behandlungen

3.4.1 Grundlagen

Die finalen Medikamentenbehandlungen erfolgten an n = 7 Zelllinien:

- Niedrige Expressionsgruppe: HROC309, HROC278Met T2 M2
- Mittlelstarke Expressionsgruppe: HROC50 T1 M5, HROC324, (HROC69)
- Hohe Expressionsgruppe: HROC18, HROC87 T0 M2

Diese Therapie wurde jeweils für 24; 72 und 2 x 72 h mit n = 4 Ansätzen (AzaT: Kontrolle, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}; AzaC: Kontrolle, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}) durchgeführt. Für die klinische Relevanz sollten möglichst auch Konzentrationen im Bereich des therapeutischen Plasmalevels des Menschen liegen. Dieses wurde bei AzaT selbst durch 1/10 IC_{50} überschritten, sodass die typische Plasmakonzentration (2 µM) mit aufgenommen wurde. Die insgesamt n = 392 Expressionswerte der qRT-PCR Messungen mit den n = 7 HERV-H spezifischen Primern sind komplett in den Tabellen A.5 (AzaT) und A.6 (AzaC) im Anhang dargestellt. Die n = 3 Behandlungsansätze (14; 72 und 2 x 72 h) einer Zelllinie wurden zeitgleich aus der identischen Passage ausgesät. Demzufolge konnten für jeden HERV-H Primer die jeweiligen RE-Werte der drei Kontrollgruppen (K) unter Berechnung der SD gemittelt werden.

3.4.2 Azathioprin

3.4.2.1 Niedrige Expressionsgruppe

Die Zelllinie HROC278Met T2 M2 zeigt, wie schon im Screening, größtenteils keine HERV-H Expression. Einzig bei X00041_h_gag sind niedrige RE (≤ 0,05) vorhanden, die jedoch unregelmäßig verteilt sind und keine Rückschlüsse auf eine Expressionsveränderung durch die AzaT-Therapie zulassen.

Auch bei HROC309 verursachte die Behandlung mit AzaT keine Steigerung der niedrigen RE bei X00041_h_gag, zusätzlich lagen hohe SD der Kontrollen vor (0,007 ± 0,005). Wie in den Abbildungen 3.25 und 3.26 erkennbar, tritt unter AzaT-Einfluss jedoch eine Hypoexpression der 1400035_h_gag und 2000045_h_gag Loci nach allen Behandlungsdauern auf. Für 1400035_h_gag zeigen die mittelhohen RE der Kontrollen besonders geringe SD (0,682 ± 0,095). Die höchste AzaT-Konzentration (IC_{50}) induziert dabei die niedrigste RE in diesem Locus, sowohl nach 24 h (0,267), 72 h (0,215) und 2 x 72 h (0,285). Der weitere Locus mit positiver RE (500503_h_L3U3) bei dieser Zelllinie weist keine Expressionsveränderungen auf.

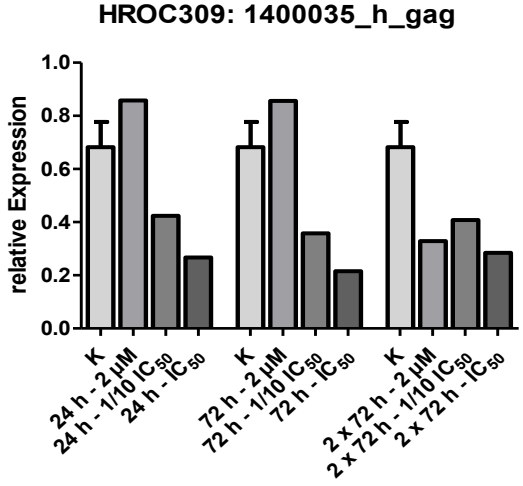

Abbildung 3.25: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach 24, 72 & 2 x 72 h AzaT-Therapie (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}).*

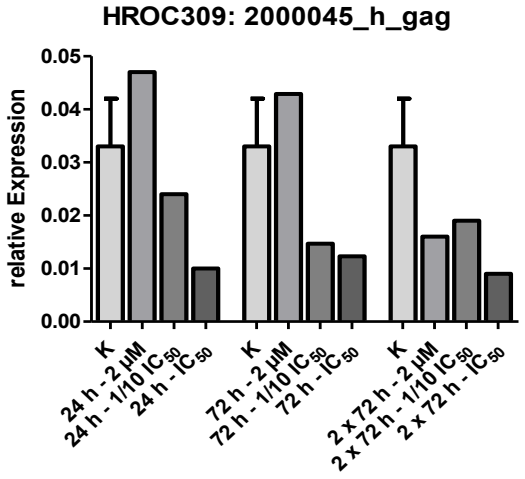

Abbildung 3.26: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 2000045_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach 24, 72 & 2 x 72 h AzaT-Therapie (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}).*

3.4.2.2 Mittlere Expressionsgruppe

HROC324 exprimiert alle n = 7 für HERV-H spezifischen Loci. Die RE der Kontrollwerte liegen zwischen 0,016 ± 0,004 (1300360_h_gag) und 0,55 ± 0,11 (X00041_gag). Die insgesamt hohen SD der Kontrollansätze, besonders bei 1300360_h_env (0,19 ± 0,17), führen zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit und lassen keine Expressionsveränderungen durch AzaT-Behandlungen in dieser Zelllinie erkennen.

Der zweite Vertreter dieser Gruppe (HROC50 T1 M5) zeigt für 2000045_h_pol und 1300360_h_gag keine positive Ausprägung (RE = 0,00). Die n = 3 am stärksten exprimierenden Loci präsentieren sehr starke SD der Kontrollmessungen (X00041_h_gag: RE = 0,38 ± 0,56; 500502_h_L3U3: RE = 3,06 ± 3,80; 1400035_h_gag: RE = 0,66 ± 0,98), welche die eigentliche Expression übersteigen und weitere Rückschlüsse auf mögliche HERV-H Expressionsveränderungen ausschließen.

In der Zelllinie HROC69 werden insgesamt n = 4 HERV-H Loci exprimiert. Für X00041_h_gag und 1300360_h_env liegen hohe RE von bis zu 0,90 bzw. 1,00 vor. Demgegenüber sind 1400035_h_gag und 500502_h_L3U3 sehr gering ausgeprägt (RE < 0,07). Insgesamt gibt es keine Hinweise auf eine durch AzaT induzierte Hyperexpression. Wie bei allen Vertretern der mittleren Expressionsgruppe weisen die Kontrollen hohe SD (X00041_h_gag: RE = 0,58 ± 0,21; 1300360_h_env: RE = 0,24 ± 0,20) auf. Demzufolge wird auch hier auf eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

3.4.2.3 Hohe Expressionsgruppe

HROC18 exprimiert n = 4 Loci, von denen 500502_h_L3U3, 1300360_h_env und 1400035_h_gag nur vereinzelt und sehr unregelmäßig ausgebildet werden. Für den X00041_h_gag Locus zeigen sich zwar in allen Behandlungszeiträumen wie zu erwarten hohe RE (max. 4,88), jedoch ohne Veränderung durch eine AzaT-Behandlung und bei der Kontrolle mit hoher SD (1,62 ± 0,51).

Anders gestalten sich die Ergebnisse bei der Zelllinie HROC87 T0 M2, die bis auf 1300360_h_gag alle untersuchten HERV-H Genorte exprimiert. Der X00041_h_gag Locus zeigt unregelmäßig verteilte hohe RE (1,13 – 3,43) mit deutlicher SD der Kontrolle (RE = 2,03 ± 0,45).
Darüber hinaus ist 500502_h_L3U3 (maximale RE = 1,14) der am zweitstärksten exprimierende Locus dieser Zelllinie. Die Werte für 2000045_h_gag und 2000045_h_pol sind hingegen sehr niedrig (RE < 0,09), mit hoher SD und ohne Hinweis auf eine Expressionsveränderung durch die mit AzaT behandelte Co-Kultur.

Auf der anderen Seite präsentieren die Loci 1300360_h_env (Abbildung 3.27), 1400035_h_gag (Abbildung 3.28) und 500502_h_L3U3 (Abbildung 3.29) den Trend zu einer durch AzaT induzierten Hypoexpression bei gleichzeitig geringen SD der Kontrollwerte. Diese Verluste der RE (K → IC_{50} über 2 x 72 h) umfassen:

- 500502_h_L3U3: 1,05 ± 0,13 → 0,529
- 1300360_h_env: 0,20 ± 0,015 → 0,104
- 1400035_h_gag: 0,162 ± 0,007 → 0,079

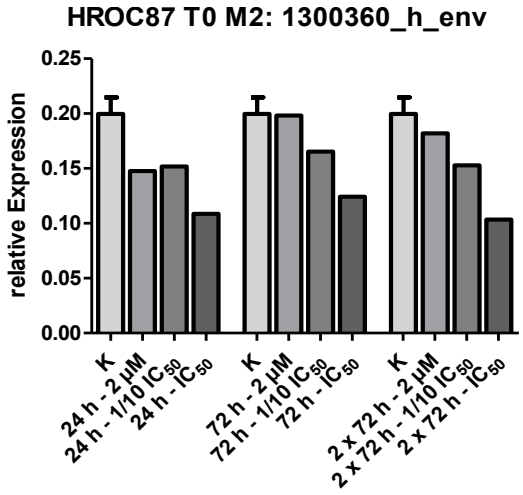

Abbildung 3.27: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 1300360_h_env Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach 24; 72 & 2 x 72 h AzaT-Therapie (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}).*

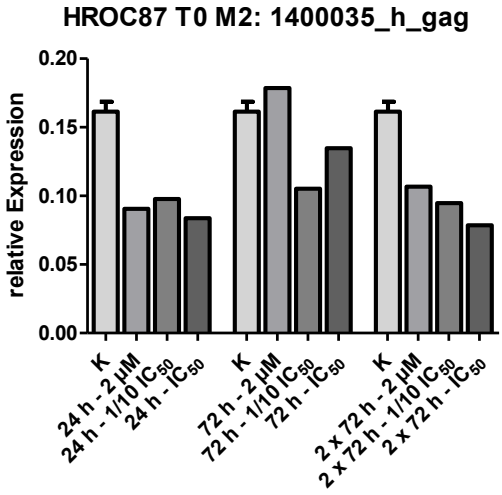

Abbildung 3.28: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach 24; 72 & 2 x 72 h AzaT-Therapie (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}).*

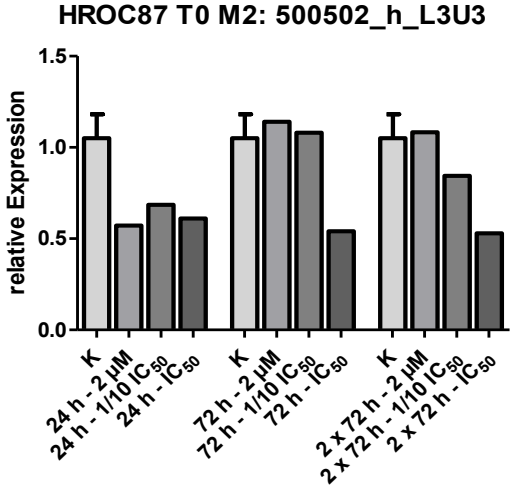

Abbildung 3.29: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 500502_h_L3U3 Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach 24; 72 & 2 x 72 h AzaT-Therapie (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}).*

3.4.2.4 Zusammenfassung Azathioprintherapie

In Zusammenschau der Ergebnisse ist keine Induktion der HERV-H durch AzaT zu beobachten. Insbesondere bei X00041_h_gag, der als stark exprimierender Locus einen besonderen Stellenwert besitzt, ist zusammengefasst für alle n = 7 Zelllinien keine signifikante Expressionsveränderung zu verzeichnen. Stellvertretend hierfür sind in Abbildung 3.30 die pro Therapieansatz gemittelten Werte nach 2 x 72 h Behandlung dargestellt.

In ausgewählten Zelllinien liegt für bestimmte Loci sogar eine Hypoexpression mit geringen SD vor. Hierzu gehören:

- HROC87 T0 M2: 1300360_h_env, 500502_h_L3U3, 1400035_h_gag
- HROC309: 2000045_h_gag, 1400035_h_gag

Dieser Trend zur Hypoexpression beim 1400035_h_gag Locus lässt sich auch in der Zusammenfassung aller n = 7 Zelllinien (Abbildung 3.31) für niedrige Medikamentenkonzentrationen (2 µM, 1/10 IC_{50}) erkennen, ohne jedoch eine Signifikanz zu erreichen. Weitergehende Expressionsvergleiche anderer Zelllinien, insbesondere aus der mittleren Expressionsgruppe, sind durch sehr hohe SD nur eingeschränkt möglich. Es gibt auch bei diesen Vertretern keine Hinweise für signifikant veränderte RE durch AzaT-Behandlungen.

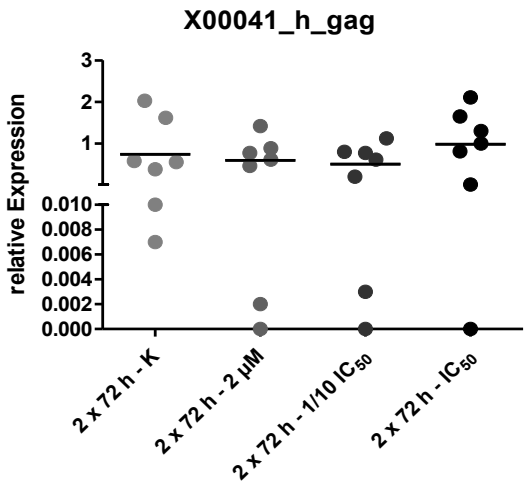

Abbildung 3.30: *RE des X00041_h_gag Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach AzaT-Behandlung über 2 x 72 h mit n = 4 Therapieansätzen (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}). Darstellung der entsprechenden Mittelwerte der jeweiligen Therapieansätze.*

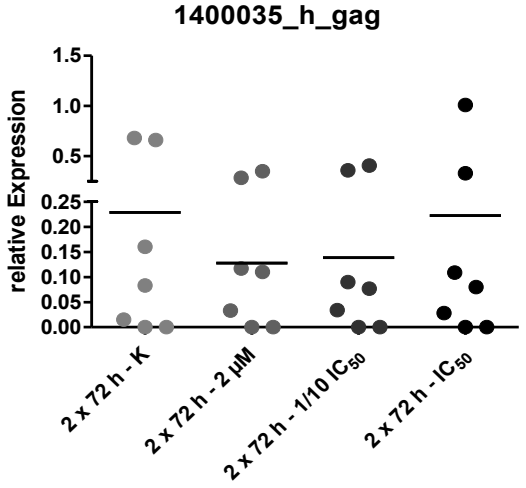

Abbildung 3.31: *RE des 1400035_h_gag Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach AzaT-Behandlung über 2 x 72 h mit n = 4 Therapieansätzen (K, 2 µM, 1/10 IC_{50}, IC_{50}). Darstellung der entsprechenden Mittelwerte der jeweiligen Therapieansätze.*

3.4.3 Azacitidin

3.4.3.1 Vitalitätsanalysen

Die finale AzaC-Therapie folgte bis auf die veränderte Verdünnungsreihe demselben Ablauf wie die AzaT-Behandlung. Durch eine ständige lichtmikroskopische Kontrolle wurde das Wachstumsverhalten aller therapierten Zellen (1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}) mit dem der Kontrollgruppen verglichen. Somit konnte zum einen die Wirksamkeit von AzaC anhand der zu erwartenden Toxizität morphologisch verifiziert und auf der anderen Seite ein zu starker Vitalitätsverlust ausgeschlossen werden. Die morphologischen Veränderungen unter der AzaC-Therapie über 2 x 72 h sind in Abbildung 3.32 anhand der Zelllinie HROC278 T0 M1 (in dieser Arbeit nicht weiter analysiert) exemplarisch dargestellt. Die zuvor scharf begrenzten und flächigen Zellkolonien verkleinern sich zusehends und zeigen durch unregelmäßigere Randstrukturen mit zentralen Vakuolisierungen einen vermehrten Vitalitätsverlust an. Infolgedessen lassen sich viele frei im Medium flottierende, avitale Tumorzellen erkennen.

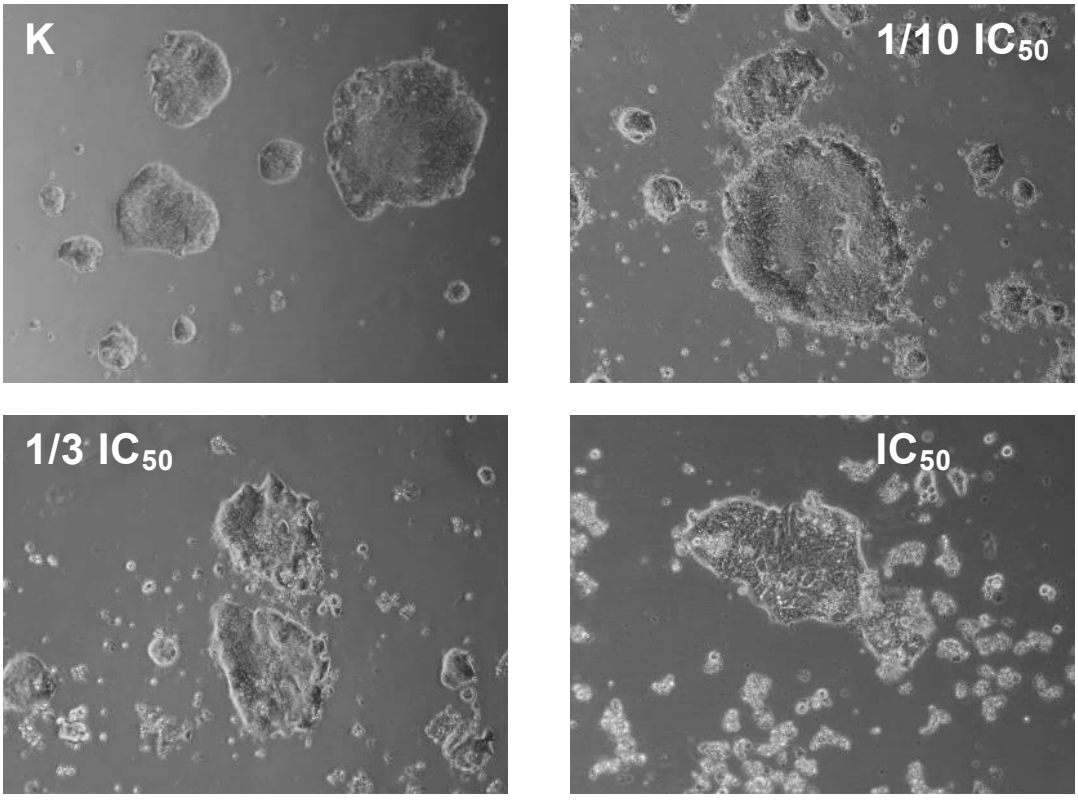

Abbildung 3.32: *Morphologie (Lichtmikroskopisch 100x vergrößert) der Zelllinie HROC278 T0 M1 nach Behandlung mit AzaC über 2 x 72 h mit den n = 4 Therapieansätzen: Oben links: K; Oben rechts: 1/10 IC_{50}; Unten links: 1/3 IC_{50}; Unten rechts: IC_{50}.*

Darüber hinaus wurde ein Teil jeder final behandelten 12-Well-Platte durch ein KV-Assay zur Quantifizierung des Zellwachstums angefärbt. Dieses Vorgehen diente neben der subjektiven Kontrolle am Lichtmikroskop als objektives Verfahren zur Überprüfung der AzaC-Toxizität. Hierfür wurden die Absorptionswerte der n = 4 Behandlungsansätze (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}) für die final untersuchten n = 7 Zelllinien (HROC69, HROC278Met T2 M2, HROC50 T1 M5, HROC324, HROC69, HROC18, HROC87 T0 M2), unterteilt nach Behandlungsdauern, zusammengefasst. Aufgrund des starken Zellwachstums, insbesondere in den Kontrollgruppen, wurde teilweise das Maximum der messbaren Absorption überschritten. Dies wurde durch eine Verdünnung aller zugehörigen Platten dieser Zelllinien ausgeglichen. Somit sind die unterschiedlichen Behandlungsansätze und –dauern insgesamt vergleichbar, jedoch nicht die absoluten Absorptionswerte. Die Abbildung 3.33 zeigt gegenüber der Kontrolle eine Abnahme der Zellvitalität mit zunehmenden AzaC-Konzentrationen. Die stärkste Absorptionsreduktion (2,34 → 1,44) findet zwischen der Kontrolle und der IC_{50} statt. Innerhalb einer Konzentrationsstufe, aber mit zunehmender Behandlungsdauer, zeigt sich bei der zweithöchsten Konzentration (1/3 IC_{50}) bereits eine leichte Vitalitätsabnahme (24 h: 1,99 → 2 x 72 h: 1,72), die bei der IC_{50} noch deutlich stärker ausgeprägt ist (24 h: 1,91 → 2 x 72 h: 0,77).

Dabei beträgt der Anteil vitaler Zellen nach 2 x 72 h Behandlung mit der IC_{50} lediglich 34 % des Kontrollwertes, anstelle der zu erwartenden 50 %. Insgesamt wurde sowohl morphologisch als auch quantitativ in der Absorptionsspektroskopie die konzentrations- und zeitabhängige AzaC-Wirkung anhand der Zellvitalität bestätigt.

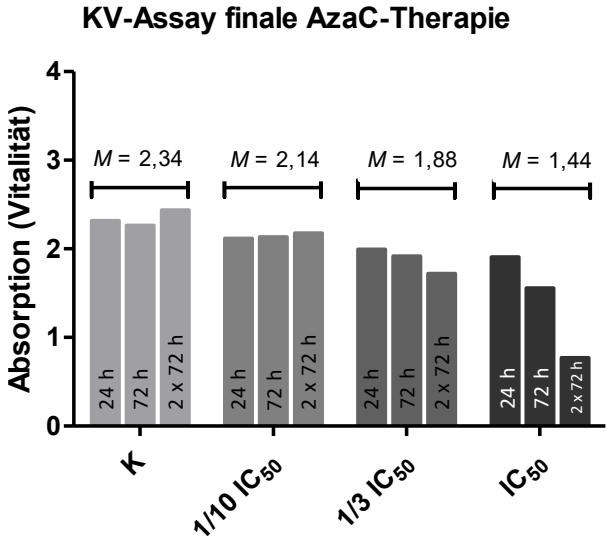

Abbildung 3.33: *Darstellung der gemittelten KV-Absorption (Zellvitalität) aller n = 7 finalen Zelllinien, unterteilt nach den n = 4 Behandlungsansätzen (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}) mit je n = 3 Behandlungsdauern (24; 72 & 2 x 72 h). Bestimmung der gemittelten Absorptionswerte (M) pro Behandlungsansatz, bestehend aus den n = 3 Behandlungsdauern.*

3.4.3.2 Niedrige Expressionsgruppe

Ähnlich wie im Screening und nach der AzaT-Therapie bildet HROC278Met T2 M2 kaum HERV-H Loci aus. Neben fehlenden Expressionen (2000045_h_pol, 2000045_h_gag, 1300360_h_gag, 1300360_h_env) wurden in der qRT-PCR bei manchen Primern (1400035_h_gag, 500502_h_L3U3) sporadisch minimale RE (≤ 0,02) gemessen.

Auch bei X00041_h_gag zeigt sich basal erwartungsgemäß keine Expression (RE = 0,00). Es lässt sich in Abbildung 3.34 jedoch nach 2 x 72 h AzaC-Behandlung eine im Verhältnis deutlich gesteigerte RE (1/10 IC_{50}**:** 0,002; 1/3 IC_{50}**:** 0,005; IC_{50}: 0,010) erkennen.

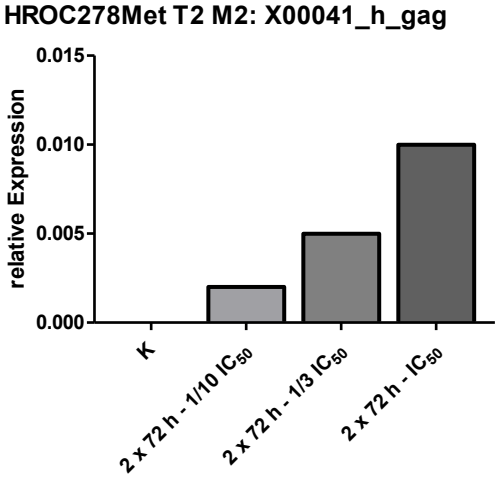

Abbildung 3.34: *RE des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC278Met T2 M2 nach 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

HROC309, als zweiter Vertreter der Gruppe mit niedriger Ausprägung, zeigt insgesamt ein sehr heterogenes Expressionsmuster. Loci mit RE = 0,00 (1300360_h_env) oder unregelmäßig niedrigen RE (500502_h_L3U3, 1300360_h_gag, 2000045_h_pol, 2000045_h_gag) lassen keine Expressionsveränderungen durch die AzaC-Therapie erkennen. Die n = 2 verbleibenden Genorte zeigen jedoch nach AzaC-Behandlung eine Expressionsveränderung. So lässt sich in Abbildung 3.35 erkennen, dass 1400035_h_gag gegenüber dem Kontrollwert (RE = 0,095 ± 0,007) durch eine AzaC-Therapie mit der IC_{50} über 72 h (RE = 0,061) und 2 x 72 h (RE = 0,041) herabreguliert wird. Wie in Abbildung 3.36 dargestellt wird jedoch die RE des X00041_h_gag Locus nach 2 x 72 h AzaC-Behandlung (1/10 IC_{50}: 0,019; 1/3 IC_{50}: 0,025; IC_{50}: 0,021) im Vergleich zum Kontrollwert (0,003 ± 0,001) induziert. Außerdem liegen für diese Zelllinie bei 1400035_h_gag und X00041_h_gag sehr geringe SD der Kontrollwerte vor.

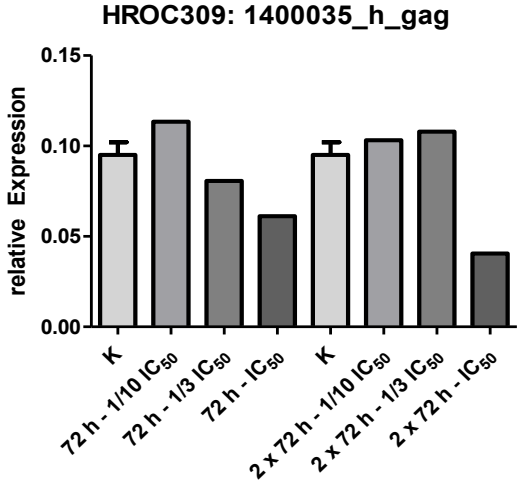

Abbildung 3.35: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach 72 & 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

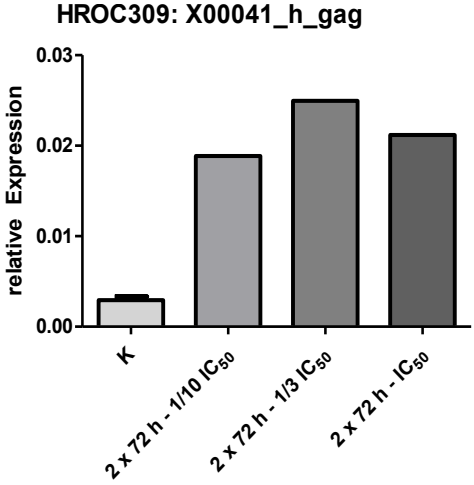

Abbildung 3.36: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

3.4.3.3 Mittlere Expressionsgruppe

Bei HROC50 T1 M5 zeigt sich für die n = 3 Kontrollgruppen des X00041_h_gag Locus eine sehr gleichmäßige RE mit geringer SD des Mittelwertes (0,017 ± 0,000). Wie in Abbildung 3.37 erkennbar, induziert eine AzaC-Behandlung eine deutliche Expressionssteigerung nach 72 h (1/10 IC_{50}: 0,067; 1/3 IC_{50}: 0,111; IC_{50}: 0,136), sowie nach 2 x 72 h (1/10 IC_{50}: 0,217; 1/3 IC_{50}: 0,471; IC_{50}: 0,865).

Für 1400035_h_gag ist ebenso eine leichte Hochregulation der RE nach 2 x 72 h AzaC-Therapie (1/10 IC_{50}: 0,049; 1/3 IC_{50}: 0,056; IC_{50}: 0,075) zu beobachten (siehe Abbildung 3.38). Der Mittelwert der zugehörigen Kontrollen (RE = 0,029 ± 0,013) weist jedoch eine erhöhte SD auf.

Der 500502_h_L3U3 Locus präsentiert in dieser Zelllinie nach 2 x 72 h ebenfalls eine Hyperexpression, jedoch nur bei den niedrigen AzaC-Konzentrationen (1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}) und nicht bei der IC_{50}-Therapie. Die verbleibenden Loci (2000045_h_gag, 2000045_h_pol, 1300360_h_gag, 1300360_h_env) zeigen keine Veränderungen durch eine AzaC-Behandlung.

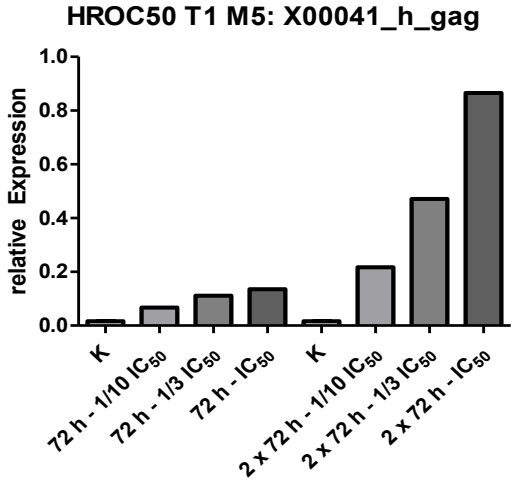

Abbildung 3.37: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC50 T1 M5 nach 72 & 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

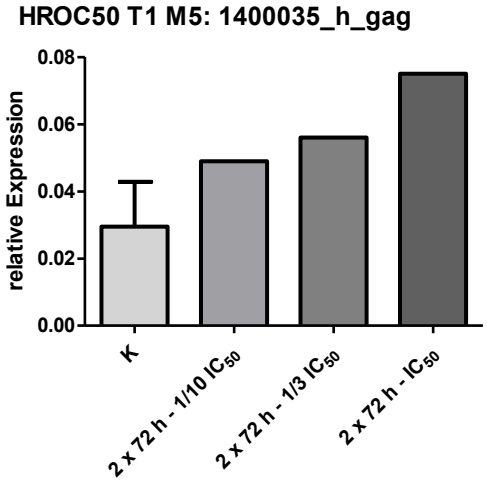

Abbildung 3.38: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC50 T1 M5 nach 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

HROC69 exprimiert einen Großteil der n = 7 für HERV-H spezifischen Loci entweder gar nicht (1300360_h_gag) oder nur mit hohen SD und ohne Hinweis auf eine Ausprägungsveränderung durch AzaC. Dabei werden sowohl niedrige (2000045_h_gag, 2000045_h_pol, 1400035_h_gag), als auch hohe RE (500502_h_L3U3, 1300360_h_env) erreicht. Auch bei dieser Zelllinie tritt für X00041_h_gag nach 2 x 72 h AzaC-Therapie eine Hyperexpression auf, jedoch nur bei den niedrigen AzaC-Konzentrationen (1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}) und nicht bei der Behandlung mit der IC_{50}.

Bei dem dritten Vertreter dieser Gruppe (HROC324) wird der X00041_h_gag Locus nach 2 x 72 h Co-Kultur mit AzaC hyperexprimiert (siehe Abbildung 3.39). Die RE steigt ausgehend vom Kontrollwert (0,25 ± 0,05) deutlich an (1/10 IC_{50}: 0,30; 1/3 IC_{50}: 0,82; IC_{50}: 1,11).
Auch 500502_h_L3U3 präsentiert eine Hochregulation der RE nach AzaC-Therapie über 2 x 72 h (K: 0,41 ± 0,12; 1/10 IC_{50}: 0,37; 1/3 IC_{50}: 0,81; IC_{50}: 0,97).
Die verbleibenden Loci werden nicht ausgebildet (2000045_h_pol) oder weisen lediglich sehr heterogene Expressionsmuster mit hohen SD auf (2000045_h_gag, 1300360_h_gag, 1300360_h_env, 1400035_h_gag).

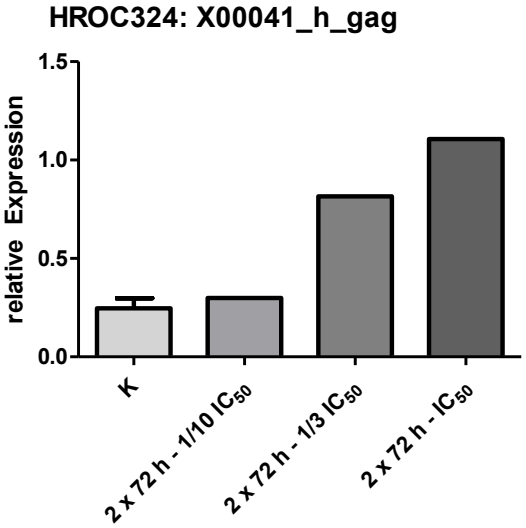

Abbildung 3.39: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC324 nach 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

3.4.3.4 Hohe Expressionsgruppe

Wie in Abbildung 3.40 dargestellt, lassen sich bei HROC18 und HROC87 T0 M2 leicht induzierte Expressionswerte für X00041_h_gag nach 2 x 72 h AzaC-Therapie erkennen. Diese sind jedoch verbunden mit hohen SD der Kontroll-RE (HROC18: 1,68 ± 0,44; HROC87 T0 M2: 3,47 ± 1,60).

Das unterschiedliche Expressionsmuster, verglichen zwischen 72 h und 2 x 72 h, verhindert zum Teil eine eindeutige Aussage zum Effekt der Therapie. So liegt zwar für HROC18 nach 2 x 72 h Behandlung (IC_{50}) eine Hochregulation vor (RE = 2,63), demgegenüber steht allerdings ein Expressionsverlust bei einer Behandlung über 72 h mit der IC_{50} (RE = 1,16). Alle anderen n = 6 Loci zeigen bei HROC18 nach 2 x 72 h Behandlung auch einen Trend zur Hyperexpression, jedoch mit sehr hohen SD und geringen Expressionswerten.

Bei HROC87 T0 M2 bietet sich für die übrigen Loci ein sehr heterogenes Bild mit Tendenzen zur Hochregulation (500502_h_L3U3) oder verminderten Expression (2000045_h_gag, 1300360_h_env). Insgesamt lassen sich hier, besonders in Zusammenschau mit der 72 h Behandlung, keine Expressionsmuster erkennen und die SD der RE sind wie beispielsweise bei 2000045_h_pol (K: 0,126 ± 0,186) sehr hoch.

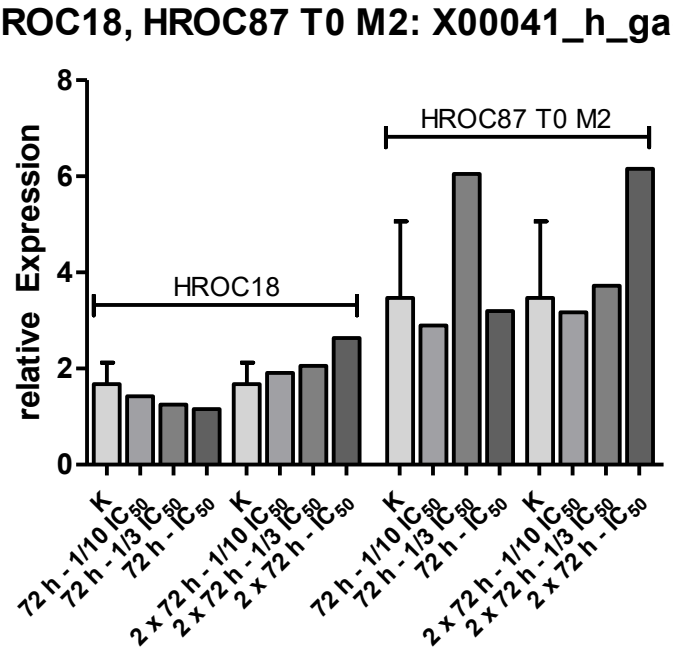

Abbildung 3.40: *RE (Kontrolle gemittelt mit SD) des X00041_h_gag Locus in den Zelllinien HROC18 und HROC87 T0 M2 nach 72 & 2 x 72 h AzaC-Therapie (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

3.4.3.5 Zusammenfassung Azacitidintherapie

In Form einer *heatmap* sind in Abbildung 3.41 die prozentualen Veränderungen der RE (2 x 72 h AzaC-Therapie vs. K) für alle untersuchten Zelllinien und Loci visualisiert. Es bestätigt sich für 2000045_h_pol und 1300360_h_gag gehäuft eine schwache bzw. fehlende basale Expression, teilweise ohne bestimmbare Ausprägungsveränderungen nach AzaC-Therapie (leere Felder). Auch treten hier, sowie bei 2000045_h_gag, vermehrt gleichbleibende RE (gelbe Felder) bzw. Tendenzen zur Hypoexpression (orange/rot gefärbt) auf. Neben der hellgrün dargestellten leichten Induktion (primär 1300360_h_env, 1400035_h_gag) ist besonders die deutliche Steigerung der RE bei zwei bestimmten HERV-H Loci (X00041_h_gag, 500502_h_L3U3) anhand der dunkelgrünen Färbung zu erkennen. Daher werden diese zwei besonders vielversprechenden Vertreter nachfolgend genauer betrachtet.

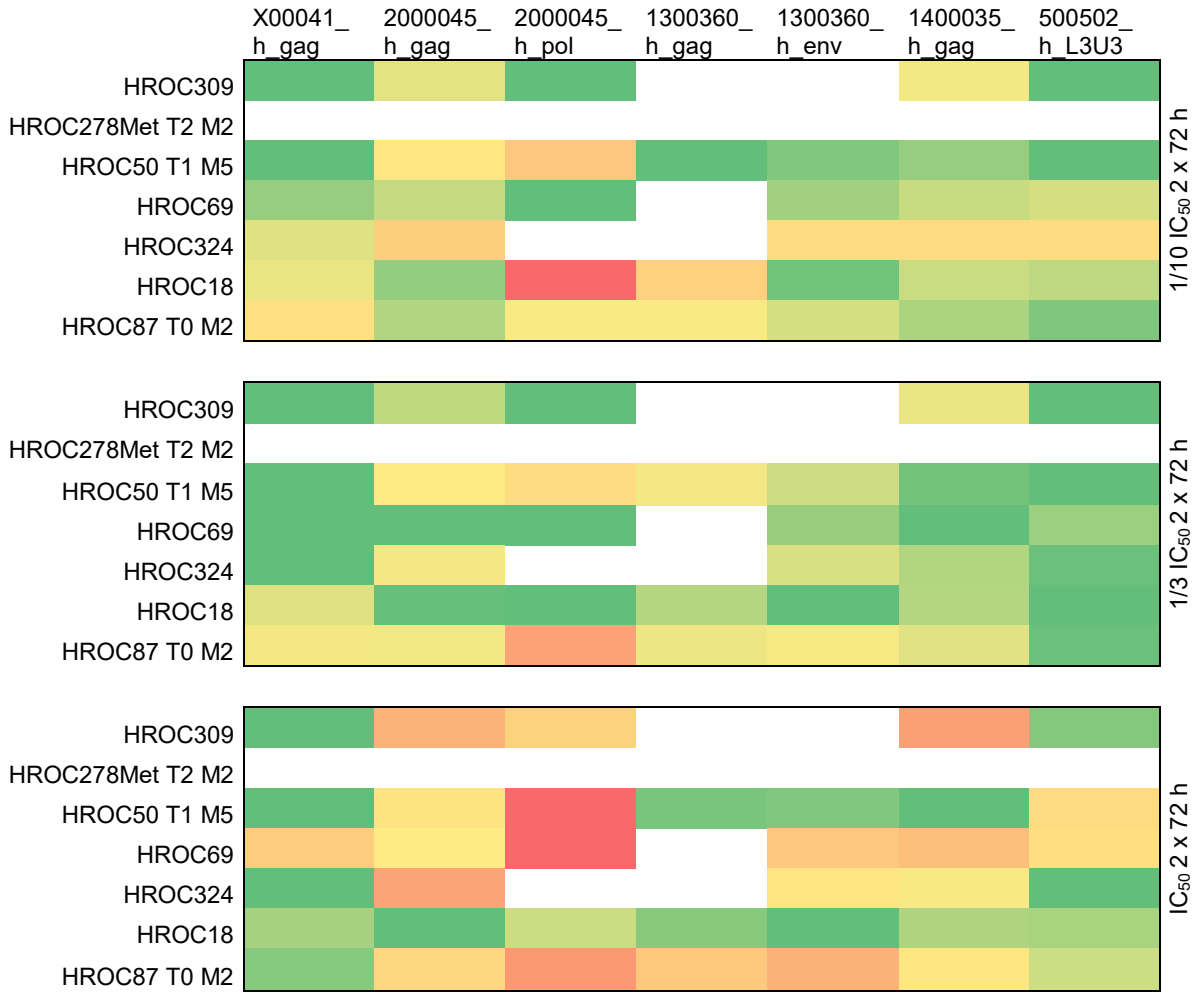

Abbildung 3.41: *Zusammenfassung (heatmap) der prozentualen Veränderung der RE gegenüber der Kontrolle für die n = 7 untersuchten HERV-H Primer (siehe obere Zeile) nach den n = 3 AzaC-Therapieansätzen: 1/10 IC_{50} (oben), 1/3 IC_{50} (mittig) und IC_{50} (unten) über 2 x 72 h. Die Messungen erfolgten an den n = 7 finalen Zelllinien (linke Spalte). Der Farbverlauf spiegelt bei der Darstellung von dunkelrot (RE↓ ≥100%), über den Mittelpunkt gelb (RE→) zu dunkelgrün RE↑ ≥100%) die entsprechende Veränderung der RE wider. In den leeren Feldern ist die Berechnung der Ausprägungsveränderungen durch schwache/fehlende basale Expressionen nicht möglich.*

So wurden in Abbildung 3.42 die RE-Werte des X00041_h_gag Locus aller n = 7 analysierten Zelllinien für die n = 4 Behandlungsansätze über 2 x 72 h dargestellt. Insgesamt zeigt sich eine Zunahme der, pro Konzentrationsansatz gemittelten, Expressionswerte mit steigenden AzaC-Konzentrationen. Die Induktion nach der Behandlung mit 1/3 IC_{50} (RE = 1,22) weist hierbei eine Signifikanz (p= 0,0156) gegenüber der Kontrolle (RE = 0,86) auf. In kürzeren Behandlungszeiträumen (24 h, 72 h) konnten solch signifikante Veränderungen nicht reproduziert werden. Es präsentierte lediglich das Behandlungsintervall über 72 h einen leicht erhöhten Mittelwert für 1/3 IC_{50}.

Der 500502_h_L3U3 Locus wird in dieser Analyse bei geringen SD insgesamt als sehr zuverlässig gewertet. Nach 2 x 72 h AzaC-Therapie mit 1/3 IC_{50} liegt besonders bei HROC50 T1 M5 eine ausgeprägte Hyperexpression vor. Diese konzentrationsabhängige Induktion ist auch beim Behandlungsansatz-spezifischen Mittelwert aller n = 7 Zelllinien zu beobachten (Abbildung 3.43) und liegt dort gegenüber der Kontrolle in einem signifikanten Ausmaß (p = 0,0156) vor.

Für weitere Loci oder Behandlungszeiträume konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Die signifikante Induktion der HERV-H in den beiden o.g. Loci durch die geringe AzaC-Dosis (1/3 IC_{50}), jedoch nicht mit der IC_{50}, steht im Einklang mit der *heatmap* (Abbildung 3.41). Dort weist die Zusammenfassung aller Behandlungsansätze über 2 x 72 h für die IC_{50}-Therapie sogar gehäuft eine RE-Verminderung auf.

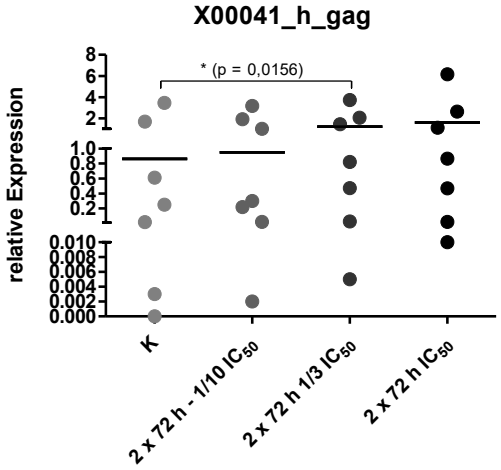

Abbildung 3.42: *RE des X00041_h_gag Locus der n = 7 untersuchten Zelllinien nach einer Behandlung über 2 x 72 h mit n = 4 AzaC-Behandlungsansätzen (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

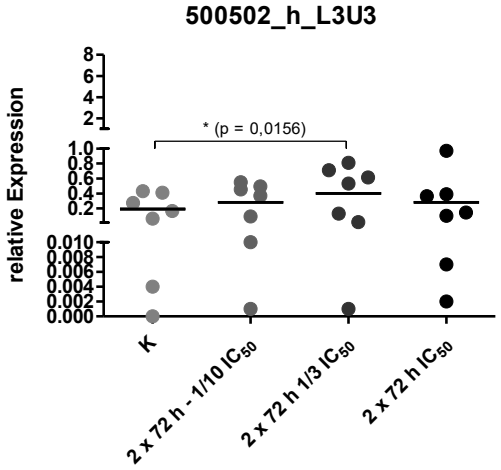

Abbildung 3.43: *RE des 500502_h_L3U3 Locus der n = 7 untersuchten Zelllinien nach einer Behandlung über 2 x 72 h mit n = 4 AzaC-Behandlungsansätzen (K, 1/10 IC_{50}, 1/3 IC_{50}, IC_{50}).*

3.5 Immunoscreen

Die signifikante Induktion des X00041_h_gag Locus durch eine spezifische AzaC-Therapie (1/3 IC_{50} für 2 x 72 h) eröffnet zahlreiche neue Möglichkeiten für zukünftige Behandlungsansätze. Ganz klar steht hierbei die Durchführung eines *killassays* durch Co-Kulturen mit Locus-spezifischen CTL im Vordergrund. Die optimale Voraussetzung hierfür wäre die Ausprägung verschiedener Oberflächenantigene wie MHC-I (HLA-A/-B/-C), MHC-II (HLA-DP/-DR) und HLA-A2.1. Diese Expressionen wurden in den n = 7 behandelten Zelllinien durchflusszytometrisch bestimmt. In Tabelle 3.2 ist der prozentuale Anteil der markierten Zellen dargestellt. Von insgesamt n = 4 Zelllinien (HROC309, HROC278Met T2 M2, HROC18, HROC87 T0 M2) mit einer starken MHC-I Expression trugen n = 2 (HROC309, HROC18) das HLA-A2.1. Leukozytenantigen. Diese doppelexprimierenden Zelllinien stellen somit geeignete Zielzellen eines für X00041_h_gag spezifischen *killassays* dar.

Tabelle 3.2: *Oberflächenexpression der Leukozytenantigene MHC-I (HLA-A/-B/-C), MHC-II (HLA-DP/-DR) und HLA-A2.1 in den n = 7 final behandelten Zelllinien (siehe linke Spalte). Darstellung des durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteils der durch den MHC-spezifischen AK markierten Zellen.*

Zelllinie	MHC-I (HLA-A/-B/-C)	MHC-II (HLA-DP/-DR)	HLA-A2.1
HROC309	59,98 % (positiv)	0,98 % (negativ)	44,08 % (positiv)
HROC278Met T2 M2	89,50 % (positiv)	0,34 % (negativ)	0,67 % (negativ)
HROC50 T1 M5	19,40 % (schwach positiv)	1,48 % (negativ)	0,02 % (negativ)
HROC324	1,12 % (negativ)	0,74 % (negativ)	0,49 % (negativ)
HROC69	1,65 % (negativ)	1,21 % (negativ)	0,29 % (negativ)
HROC18	76,81 % (positiv)	2,24 % (negativ)	57,17 % (positiv)
HROC87 T0 M2	74,45 % (positiv)	0,73 % (negativ)	0,02 % (negativ)

4 Diskussion

4.1 Behandlung des kolorektalen Karzinoms

4.1.1 Aktuelle Herausforderungen der Therapie

In ihrer aktuellen Stellungnahme von 2018 betont die Weltgesundheitsorganisation noch einmal die immense Bedrohung der globalen Gesundheit durch bösartige Neoplasien. So ist Krebs als zweithäufigste Todesursache für einen von sechs Sterbefälle verantwortlich (Weltgesundheitsorganisation, 2018). Eine besondere Rolle spielt dabei das KRK, welches 2018 mit mutmaßlich weltweit 881.000 Verstorbenen den zweithöchsten Anteil (9,2 %) der Krebstodesfälle verursachte. Global wird, insbesondere in den sich entwickelnden Ländern, eine Zunahme der Inzidenz und Mortalität des KRK als Indikator der sozioökonomischen Entwicklung entweder bereits beobachtet (z.B. in China, Brasilien) oder noch erwartet (Bray et al., 2018). Die Grundpfeiler der klassischen Therapie des KRK sind dabei, abhängig von Stadium und Lokalisation, die chirurgische Entfernung, sowie die Radio- und Chemotherapie. Deren optimierte Anwendung und zusätzliche Präventionsmaßnahmen, wie beispielsweise die Koloskopie (Jacob et al., 2012), sind wahrscheinliche Ursachen der in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Senkung der Sterberate von KRK-Patienten in Deutschland. Trotz diesem positiven Trend betont besonders das geringe 5-Jahres-Überleben (ca. 10 %) beim metastasierten KRK die dringende Notwendigkeit der Entwicklung neuer Behandlungsansätze über die bekannten Therapeutika hinaus (Brenner et al., 2014).

4.1.2 Immuntherapie

4.1.2.1 Grundlagen Tumorimmunologie

Die Tumorentwicklung wird, neben vielen anderen Einflüssen, stark durch eine wechselseitige Interaktion mit dem Immunsystem *(immunoediting)* geprägt. Als Ausgangspunkt dient hierfür die protektive Überwachungsfunktion der körpereigenen Abwehrkräfte *(immunosurveillance*), mit der grundsätzlich maligne entartete Zellen erkannt und bekämpft werden können (Kim et al., 2007). So ist das KRK im Frühstadium ohne Metastasierungshinweise mit einer, gegenüber der fortgeschrittenen Vergleichsgruppe, signifikant gesteigerten Infiltration von T-Lymphozyten ($CD4^+$ und $CD8^+$) assoziiert und zeigt keine erhöhte (tumorfördernde) Inflammation oder Immunsuppression (Pagès et al., 2009). Die Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorbekämpfung wird durch die erhöhten Inzidenzen

maligner Neoplasien in immunsupprimierten Patienten nach Organtransplantationen weiter belegt (Penn, 1974).

Die zusammenfassende Theorie des *immunoeditings*, die 2002 von der Gruppe um Robert David Schreiber publiziert wurde, beschreibt die drei sog. „E-Schritte“: Eliminierung, Equilibrium und *escape* (Entkommen). Die Eliminierung wird im Rahmen der angeborenen Immunantwort u.a. durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) initiiert und über die Produktion von proinflammatorischen Chemokinen und IFN-γ, sowie der Antigenpräsentation aus lysierten Tumorzellen mithilfe von dendritischen Zellen (DC), vorangetrieben. Final werden dann die spezifischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten rekrutiert. Diese Mechanismen, die weitestgehend der *immunosurveillance* entsprechen, münden im Idealfall in eine erfolgreiche Tumoreliminierung. Der Grundstein für eine manifeste Tumorerkrankung wird im nächsten Schritt, dem Equilibrium, begründet. Analog zur darwinistischen Selektionstheorie provoziert das Immunsystem die Entstehung gering immunogener und somit „resistenter“ Tumorzellen, die sich auf verschiedenen Wegen (s.u.) der Bekämpfung entziehen. Besteht in dieser Phase noch ein Kräftegleichgewicht zwischen Tumor- und Immunzellen, so findet im finalen *escape*-Stadium die unkontrollierte Ausbreitung der (epi-)genetisch angepassten Tumorzellen statt (Dunn et al., 2002).

Die so aufgeworfenen Fragen, welche *escape*-Mechanismen KRK entwickelt haben und wie die immunologische Detektion dieser Tumorzellen erfolgen kann, sind nicht nur eng miteinander verknüpft, sondern auch entscheidend für die immuntherapeutische Zielstellung dieser Arbeit, sodass sie noch einmal grundsätzlich beleuchtet werden:

Genprodukte der Tumorzellen können proteasomal prozessiert und anschließend über MHC-I den Rezeptoren (T-Zellrezeptor, CD8) der CTL präsentiert werden. Neben dieser Interaktion sollte das „ideale“ Tumorantigen für den Tumorstoffwechsel essenziell sein und konstant, sowie exklusiv auf maligne entarteten Zellen exprimiert werden (Krishnadas et al., 2013). Liegt die letztgenannte Eigenschaft vor, werden sie als tumorspezifische Antigene (TSA) bezeichnet und weisen die positiven Merkmale einer hohen Avidität und Immunogenität gegenüber den körpereigenen Abwehrmechanismen auf (Wagner et al., 2018). Deren wichtigste Vertreter sind Neoantigene, die individuell durch genetische Veränderungen (z.B. Translokationen), posttranslationale Modifikationen, Insertionen, Deletionen oder *spliced peptides* in Tumoren neu entstehen bzw. erstmals exprimiert werden. Genprodukte onkogener Viren, wie z.B. das retrovirale HTLV-1 Tax (siehe Kapitel 1.2), zeigen ebenso eine hohe Tumorspezifität (Bräunlein und Krackhardt, 2017; Jacobson et al., 1990). Demgegenüber stehen die weitaus häufigeren tumorassoziierten Antigene (TAA),

deren meiste Vertreter als ursprünglich natürliche Genprodukte in Tumoren überexprimiert vorliegen. Mögliche Beispiele im KRK sind das carcinoembryonale Antigen (CEA), Mucin-1 oder das Melanomantigen (MAGE) (Wagner et al., 2018). Wie alle Tumoren hat auch das KRK eine Vielzahl von Strategien entwickelt um das Immunsystem zu unterdrücken, sich diesem zu entziehen und ein wachstumsförderndes Milieu zu erschaffen. Einige der zentralen immunsuppressiven Mechanismen, die 2006 von Evans et al. zusammengefasst wurden, sind in der Abbildung 4.1 dargestellt. Die induzierten Zytokine, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Gewebshormone können sowohl Ursache, als auch Wirkung der vielfältigen Immunzellveränderungen sein und sind dementsprechend mittig angeordnet. Über verschiedene Signalwege kommt es zur vermehrten Differenzierung der $CD4^+$ T-Lymphozyten zur Th2-Subgruppe, einem Aktivitätsverlust von NK-Zellen, dem vermehrten Auftreten von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), sowie einer eingeschränkten Funktion der CTL und DC (Evans et al., 2006). Weitere ausgewählte immunmodulatorische Mechanismen des KRK sind:

- HLA-G Expression: Apoptose von CTL und NK-Zellen (Fukushima et al., 1998).
- Verminderte HLA-I Expression: reduzierte Tumorantigenpräsentation (López-Nevot et al., 1989).
- Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) Expression: Hemmung der Invasion von T-Zellen u.a. via Tryptophanreduktion (Brandacher et al., 2006).
- Unterdrückung des Apoptoserezeptors Fas auf der Zelloberfläche (Ogawa et al., 2004).
- Expression vom *programmed death receptor 1* (PD-1) und dem zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Antigen 4 (CTLA-4) (Passardi et al., 2017).

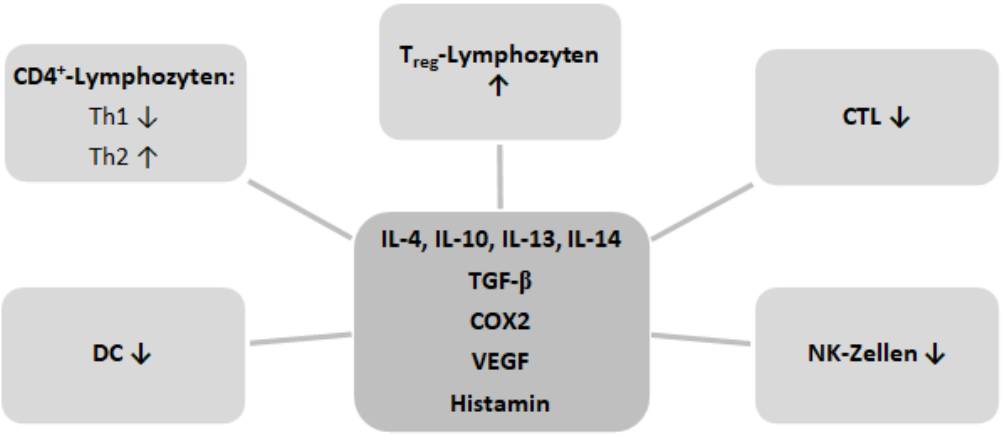

Abbildung 4.1: *Immunsuppressive Mechanismen des KRK. COX2 = Cyclooxygenase-2; CTL = Zytotoxische T-Lymphozyten; IL = Interleukin; NK-Zellen = Natürliche Killerzellen; TGF-β = Transforming growth factor beta; Th = T-Helferzellen; T_{reg} = Regulatorische T-Lymphozyten; VEGF = Vascular endothelial growth factor (Evans et al., 2006).*

4.1.2.2 Aktuelle Immuntherapie beim KRK

Bereits gut etablierte Vertreter der Tumorimmuntherapie sind spezifische monoklonale AK. Eine Untergruppe ist die *targeted therapy*, bei der ebendiese AK direkt an Tumorzellen ihre Wirksamkeit entfalten. Demgegenüber stehen die Immuncheckpointinhibitoren (ICI), die als aktive Immuntherapeutika über die Stimulation der körpereigenen Abwehrkräfte bzw. Unterdrückung bestimmter *escape*-Mechanismen (siehe vorheriges Kapitel) einen anti-Tumor-Effekt herbeiführen (Galluzzi et al., 2014). Mit Cetuximab ist seit längerer Zeit die *targeted therapy* fester Kombinationspartner einer Chemotherapie des metastasierten linksseitigen Kolonkarzinoms. Dieser Wirkstoff, der nur bei Patienten mit einem Wildtyp des Ras-Proteins angewendet werden sollte, supprimiert durch Blockade des *epidermal growth factor receptors* (EGFR) intrazelluläre Wachstumskaskaden und scheint zusätzlich immunstimulativ zu wirken (Jonker et al., 2007; Schmiegel et al., 2017).

Die ICI als Immuntherapeutika im engeren Sinne halten aktuell in rasantem Tempo Einzug in die Behandlung solider Tumoren. Dabei blockieren anti-CTLA-4 AK (z.B. Ipilimumab) die gleichnamigen Rezeptoren an der Oberfläche von CTL und verhindern somit deren Unterdrückung durch Vertreter der B7-Familie (CD80, CD86). Auch die Expression von PD1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann durch die Bindung des entsprechenden Liganden (PDL-1) vor allem in der Effektorphase eine Apoptose der T-Lymphozyten initiieren. Entsprechende Inhibitoren dieses Immuncheckpoints können u.a. Pembrolizumab und Nivolumab (anti-PD1), sowie Atezolizumab und Durvalumab (anti-PDL-1) sein (Kyi und Postow, 2014).

Durch die ersten positiven Behandlungsergebnisse u.a. für Ipilimumab in Melanom-Patienten (Hodi et al., 2010) und Nivolumab bei Probanden mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Borghaei et al., 2015) wurde das große Potenzial der ICI bei der Behandlung von soliden Tumoren mit hoher Mutationslast deutlich. Diese Wirkung wird primär durch die dortige Entstehung von besonders immunogenen Neoantigenen und der folgenden CTL-Induktion erklärt (Westdorp et al., 2016). Auch Tumoren mit MSI-H, allen voran KRK, sind durch einen MMR-Defekt (siehe Kapitel 1.1.3) mit verstärkten somatischen Mutationen assoziiert und profitieren demnach von einer Pembrolizumab-Behandlung (Le et al., 2015). Daraufhin wurde 2017 in den USA mit diesem anti-PD1 AK erstmals eine Tumortherapie spezifisch für einen positiven Biomarker, unabhängig von dessen Organlokalisation, zugelassen. Die Anwendung bei diesem MMR-defizienten Subtyp des KRK betrifft irresektable bzw. metastasierte Vertreter, die trotz Chemotherapie einen Progress aufweisen (Marcus et al., 2019). Die aktuelle deutsche S3-Leitlinie des KRK berücksichtigt noch nicht den MSI-Status, auch aufgrund der bis dato nicht vorhandenen europäischen Zulassung der ICI für diese Therapieindikation (Schmiegel et al., 2017). Neben MSI–H Tumoren scheint auch der sog. hypermutierte Phänotyp mit Genmutationen der DNA-Polymerase (POLE und POLD) für eine ICI-Therapie prädisponiert zu sein (Rayner et al., 2016). Die aktuellen Limitierungen beim Einsatz der ICI in der Behandlung des KRK betreffen vor allem MSS-Vertreter. Jedoch kann eine Kombinationstherapie z.B. mit Cobimetinib (MAPK-Inhibitor) offenbar die geringe Immunogenität dieser Gruppe und das damit ausbleibende Ansprechen auf eine ICI-Therapie steigern (Emambux et al., 2018). Inwiefern AzaC als möglicher Kombinationspartner in Betracht kommt wird in Kapitel 4.4.2 noch einmal ausführlich diskutiert.

Viele weitere immuntherapeutische Möglichkeiten sind noch nicht etabliert, wobei jedoch einige Strategien, wie KRK-spezifische Impfungen, bereits aussichtsreiche Ergebnisse in diversen Studien lieferten. Deren Status quo wurde jüngst von Wagner und Kollegen aus der AG MOI zusammengefasst:

So erweist sich die Peptidimpfung basierend auf einem singulären TAA (z.B. CEA, MAGE, Mucin-1) klinisch als wenig effektiv. Die Kombination von bis zu sieben dieser Vertreter, sowie die personalisierte Peptidvakzinierung, führen jedoch zu einer CTL-Induktion. Der aktuelle Fokus liegt allerdings eindeutig auf der (noch) aufwändigen Identifizierung von Neoantigenen (siehe Kapitel 4.5.2). Dabei ist der Ursprung der Peptide für KRK-Vakzine primär in Leserasterverschiebungen (z.B. KRAS, TGFβIIR, CDX2, Caspase 5) oder auch alternativen Splicevarianten einzuordnen. Vor allem für die Therapie des MSS-KRK geben die Autoren einen

multifaktoriellen Ansatz der Peptidvakzinierung in Kombination mit Immunstimulatoren, immunogenen Chemotherapeutika oder ICI als vielversprechende Therapieoption an (Wagner et al., 2018). Durch den Einsatz des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) und Interleukin (IL) 2 als Bestandteile des chemotherapeutischen GOLFIG Schemas (Gemcitabin, Oxaliplatin, Levofolinat, 5-Fluoruracil, GM-CSF, IL-2) konnte außerdem generell die Chance einer Immunstimulation bei der Behandlung des KRK aufgezeigt werden (Correale et al., 2014). Die aktuell großen Fortschritte bei der Erforschung von T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) lassen auf deren zeitnahe Etablierung beim KRK hoffen. Das Potenzial retroviraler Genelemente für diese Therapieform wurde bereits durch die positiven Ergebnisse für HERV-K env im Bereich des Mammakarzinoms belegt (Zhou et al., 2015).

4.2 Verbesserungsmöglichkeiten der Methodik

Als Messmethode für die RE der HERV-H auf RNA-Ebene wurde die qRT-PCR genutzt. Die Analyse der sieben spezifischen Primer erfolgte mittels SYBR Green System, das durch Doppelstrangeinlagerung unspezifisch eine DNA-Amplifikation anzeigt. Bei den ermittelten Ct-Werten der Probendubletten lagen teilweise hohe SD vor und die Negativkontrollen zeigten Werte im signifikanten Bereich an. Über die Analyse der Schmelztemperaturen, die abhängig von Länge und Basenzusammensetzung des Amplifikats sind, konnten diese Abweichungen der *non template control* als Primerdimerisierungen und nicht als Kontaminationen identifiziert werden. Die Bestätigung erfolgte hierfür zusätzlich mittels Gelelektrophorese. Für viele Messwerte der Proben lagen jedoch final zwei Schmelzkurven (entsprechend der Positiv- und Negativkontrolle) vor. Die Interpretation des zugehörigen Ct-Wertes, der beide Primerreaktionen einschließt, ist daher nur eingeschränkt möglich und erscheint insbesondere im Bezug zum weitaus spezifischeren TaqMan System der GAPDH-Untersuchung als problematisch. Dieses basiert auf Sonden, die im Rahmen der DNA-Amplifikation durch die Taq-Polymerase hydrolysiert werden. Als Folge entfällt die Suppression der sondengebundenen Reporter-Fluoreszenz durch den ebenso gekoppelten *quencher* (Kubista et al., 2006; Tajadini et al., 2014).

Leider konnte für die Analyse der HERV-H kein solch spezifisches Primersystem mit entsprechender Sonde entworfen werden. Nichtdestotrotz kann hierbei von einem systematischen Fehler gesprochen werden, der bei allen sieben mittels SYBR Green analysierten HERV-H Primern bzw. allen medikamentösen Behandlungsansätzen im

gleichen Maße auftritt und somit die hier durchgeführten gepaarten Analysen zulässt. Im Rahmen der deutlich verschiedenen SD zwischen den einzelnen Primern kristallisierte sich der besonders etablierte Vertreter X00041_h_gag als sehr zuverlässig heraus. Da sich die meisten Analysen (Expressionsvergleich RNA vs. Protein; Großteil der medikamentösen Induktionen; finaler immuntherapeutischer Ansatz) auf diesen X-chromosomalen Referenzlocus bezogen, wurde in dieser Arbeit eine maximal mögliche Zuverlässigkeit erreicht.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Zelllinien (siehe Kapitel 3.1) kann sich auf quantitative Analysen, wie beispielsweise den KV-Assay zur IC_{50}-Bestimmung, negativ auswirken. Dies ist insbesondere bei semiadhärent wachsenden Zelllinien (z.B. HROC147 T0 M1) oder schnell proliferierenden Vertretern mit einem instabilen und gering adhärenten Monolayer (z.B. HROC285 T0 M2) der Fall. Bei der finalen IC_{50}-Medikamentenbehandlung über 2 x 72 h auf 12-Well-Platten wurde schließlich eine reduzierte Vitalität von lediglich 32 % des Kontrollwertes gemessen. Das Zellwachstum findet größtenteils im Randbereich der Kavitäten statt. Eine Vergrößerung des Verhältnisses Fläche zu Umfang der Kavitäten scheint demnach zu einer verstärkten Sensibilität der Zellen gegenüber potenziell toxischen Einflüssen zu führen.

Auch wenn die durch AzaC induzierte genetische Hypomethylierung als treibende Kraft für die Induktion der HERV-H angesehen wird, kann dieser Mechanismus nicht mit Hilfe der erfolgten Versuche validiert werden. Für weitergehende Analysen ist die Durchführung eines Methylierungsassays möglich. Als geeigneter Vertreter gilt die Bisulfid-Sequenzierung, die bereits an Sequenzen der HERV-H angewendet wurde (Wentzensen et al., 2007). Durch die Ungenauigkeit dieser Methode mit einem hohen Risiko an falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen wird jedoch gleichzeitig eine mRNA-Analyse empfohlen (Mullins und Linnebacher, 2012a).

Grundsätzlich ist der gesamte Versuchsaufbau sehr breit aufgestellt und umfasst Screeninganteile und zwei Medikamentenbehandlungen mit jeweils vier Konzentrationen (inkl. Kontrolle) über drei Zeiträume. Die bisher einmalige Triplettmessung der relativen HERV-H Locusexpressionen sollte für die erfolgreichen Behandlungsansätze daher erneut dreifach durchgeführt werden. Den insgesamt signifikanten Expressionssteigerungen nach den AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h liegen lediglich sieben zusammengefasste Zelllinien zugrunde, sodass für eine Verifizierung der Ergebnisse die Stichprobe erhöht werden müsste.

4.3 Screening der basalen HERV-Expression

Die Kausalität für die bereits dargestellten Assoziationen zwischen erhöhter HERV-Expression und spezifischen malignen Neoplasien (siehe Tabelle 1.1) wurde bis heute noch nicht eindeutig beschrieben. So kann die erhöhte HERV-Transkription zum einen als Ursache für die Entartung, aber auch als ein Symptom transkriptioneller Dysregulation in der Tumorzelle angesehen werden (Bhardwaj und Coffin, 2014). Unabhängig davon steht bei der Diagnostik und Therapie des KRK die Familie der HERV-H weiterhin im Fokus aktueller Forschung und bedarf einer genauen basalen Expressionsanalyse. Wegweisend hierfür sind primär die Arbeiten von Pérot et al. und Mullins et al., sowie die erweiterte KRK-Tumorbank der AG MOI.

Die sieben HERV-H spezifischen Primer wurden in dieser Arbeit erfolgreich an n = 26 verschiedenen KRK-Zelllinien, und demnach außerhalb des ursprünglich publizierten primären Tumormaterials, verwendet (Pérot et al., 2015). Anschließend konnten n = 24 der analysierten Zelllinien erstmals gleichmäßig in drei HERV-H Expressionsgruppen (niedrig, mittel, hoch) aufgeteilt werden. Somit wurde für diese KRK-Zelllinien, neben anderen Kriterien wie dem MSI-Status, Methylierungslevel und Mutationsstatus (KRAS, BRAF, TP53, APC), ein weiteres Klassifikationsmerkmal etabliert. Einschränkend bei der Klassifikation müssen hierbei eine unzureichende Datengrundlage bzw. technische Limitationen (siehe Kapitel 4.2) angegeben werden. Durch zukünftige Versuchsreihen sollten die zulässigen Expressionswerte pro Gruppe reevaluiert werden um somit die Klassifikation weiter zu verbessern.

Einen ähnlichen Ansatz hat die Gruppe um Desai und Kollegen gewählt, die KRK-Zelllinien auf der Basis des Expressionsmusters repetitiver Elemente (HERV, LINE-1) erweitert molekular klassifizierte. Hierbei zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen dem DNA-Methylierungslevel und der Ausprägung von LINE-1 oder globalen HERV. Jedoch wurde die Familie der HERV-H explizit von dieser Co-Regulation ausgeklammert. Die für Zelllinien mit starker Ausprägung der LINE-1 vorliegende signifikante inverse Korrelation mit MSI-H und BRAF-Mutationen, sowie der Assoziation mit TP53-Mutationen, unterstreicht die Relevanz repetitiver Elemente bei der molekularen Klassifikation des KRK (Desai et al., 2017).

Die Expression der in dieser Arbeit verwendeten für HERV-H spezifischen Primer korreliert in den ursprünglichen Analysen positiv mit dem Subtyp der MSI-H (Pérot et al., 2015). Da die Expression von HERV-H nicht mit der von LINE-1, die wiederum mit MSS assoziiert ist, einhergeht (Desai et al., 2017), kann weiterhin in den vorliegenden Zelllinien eine positive Korrelation zwischen HERV-H und MSI-H postuliert werden. Sowohl die hoch, als auch die mittel exprimierende Gruppe weisen

viele Vertreter (4/8 bzw. 6/8 Zelllinien) mit einer MSI auf (siehe Abbildung 4.2). Leider ist der Vergleich zu den Mitgliedern der Gruppe mit niedriger Ausprägung aufgrund noch fehlender molekularer Klassifizierungen nicht möglich.

Im Hinblick auf mögliche immunologische Therapieansätze zeigt sich noch eine weitere Bedeutung der basalen Klassifikation für HERV-H in KRK-Zelllinien. So weisen Vertreter mit hoher Expression der HERV-H eine geringe Infiltration immunsupprimierender sog. *forkhead-box-protein P3* positiver T_{reg}-Lymphozyten auf und werden somit als besonders geeignete Vertreter für eine ICI-Therapie angesehen (Desai et al., 2017).

Im Rahmen zukünftiger Untersuchungen erscheint ein tiefergehender Vergleich der molekularen Veränderungen, inklusive der für HERV-H spezifischen Expressionswerte, in den primären KRK-Zelllinien als sinnvoll. Schon jetzt wurde diese Einteilung verwendet um ausgehend vom ursprünglichen Expressionslevel eine mögliche Induktion der HERV-H durch hypomethylierende Medikamentenbehandlungen zu beschreiben. Weitere mögliche Ansätze, die auf dieser Klassifikation basieren könnten, sind u.a. die Analysen der Chemotherapiesensitivität oder des Wachstumsverhaltens. So wurde beispielweise *in vitro* an Kolonkarzinomzelllinien eine Assoziation zwischen HERV-Expression und Chemotherapieresistenz dargelegt (Díaz-Carballo et al., 2015).

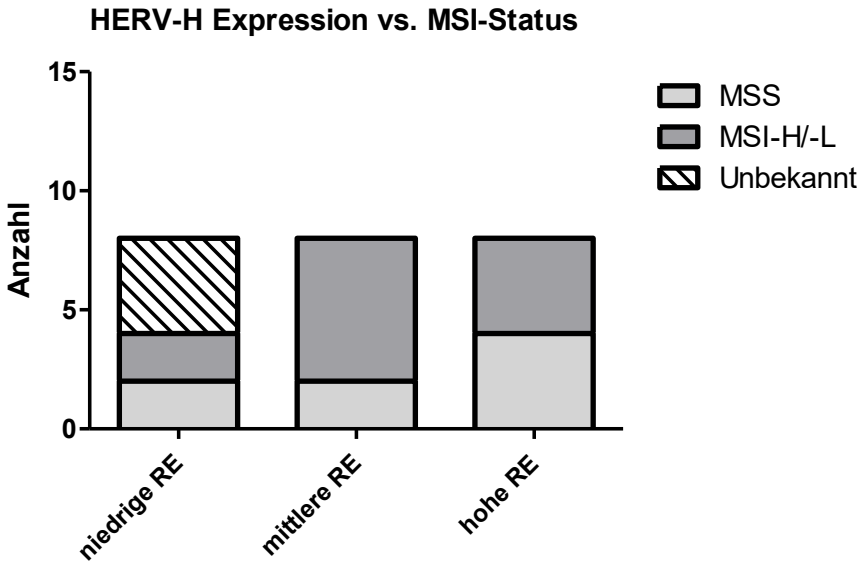

Abbildung 4.2: *Analyse der n = 24 im Screening klassifizierten Zelllinien nach ihrem Mikrosatellitenstatus. Die Darstellung erfolgt sortiert nach Expressionsklasse (niedrig, mittel, hoch) mit je n = 8 Vertretern. Der Mikrosatellitenstatus ist unbekannt (schraffiert), MSS (hellgrau) oder MSI-H/-L (dunkelgrau).*

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Expression der HERV-H auf RNA-Ebene, basierend auf der neu eingeführten Klassifikation, mit der auf Proteinebene verglichen werden. Für diese Analyse lag der Fokus auf dem 14H11G1 AK gegen das für HERV-H spezifische gag-Protein (Mullins et al., 2016). Konkordant mit der RNA-Expression des X00041_h_gag Referenzlocus wies die Gruppe mit hoher RE auch die meisten von 14H11G1 markierten Zellen auf, die sich in der mittel exprimierenden Gruppe signifikant reduzierten. Die Gruppe mit niedriger Ausprägung zeigte jedoch eine gesteigerte spezifische gag-Expression.

Als Ursache dessen ist anzuführen, dass die für HERV-H festgelegte Gruppendefinition auf Basis der spezifischen RNA-Primer, inklusive dem hier angeführten X00041_h_gag Locus, erfolgte. Der gewebs-, aber nicht tumor- und locusspezifische 14H11G1 AK ist wesentlich globaler, sodass dessen erhöhte Expressionswerte in der Gruppe mit hoher RE in diesem Zusammenhang als „falsch positiv“ angesehen werden können. Eine Assoziation zwischen der RNA- und Proteinebene ist durch die vielversprechenden Ergebnisse der Gruppe mit hoher RE trotzdem anzunehmen und erlaubt weitergehende Analysen. Mögliche klinische Einsatzgebiete der für HERV-H spezifischen gag-AK werden bei der Primariussuche oder als Biomarker im Rahmen der Frühdiagnostik, z.B. mittels Bluttest (s.u.), des KRK gesehen (Mullins et al., 2016).

Für zukünftige Analysen des 14H11G1 AK ist der Vergleich mit globaleren und dabei trotzdem für HERV-H spezifischen RNA-Primern ein möglicher Ansatz. Potenzielle Kandidaten sind die mit Kolongewebe physiologisch nicht reagierenden Primer envH1, envH2, envH3 (de Parseval et al., 2003). Darüber hinaus sollte untersucht werden inwiefern durch eine AzaC-Therapie, analog zur Induktion auf RNA-Ebene, auch eine Expressionssteigerung der für HERV-H spezifischen gag-Proteine möglich ist.

4.4 Medikamentöse HERV-Induktion

4.4.1 Azathioprin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus der Medikamentenwirksamkeit von AzaT und AzaC auf die Induktion der HERV-H via DNA-Hypomethylierung gelegt. Vor allem die Thiopurine, inklusive AzaT, können als Immunsuppressiva jedoch vielfältig die Tumorgenese und –behandlung beeinflussen und müssen somit in diesem Therapiekontext kritisch beleuchtet werden:

Unter AzaT-Therapie zeigen Patienten mit IBD ein generell erhöhtes Risiko für maligne Neoplasien, insbesondere des Lymphgewebes und des Harnapparates (Pasternak et al., 2013). Die Behandlung mit Thiopurinen deutet ebenso auf ein leicht erhöhtes Erkrankungsrisiko für den nicht-melanomatösen Hautkrebs hin (Hagen und Pugliano-Mauro, 2018). Der Bericht eines 57-jährigen Patienten, der nach einer Behandlung mit 6-MP über 20 Jahre insgesamt n = 84 dieser Neubildungen entwickelte, veranschaulicht zusätzlich einen möglichen tumorfördernden Effekt von AzaT (De Luca et al., 2012).

Auch die rasche Entstehung (≤ 1 Jahr) eines Kolonkarzinoms in einem Morbus Crohn Patienten nach langjähriger AzaT-Therapie ist ein weiteres Indiz hierfür (Kuehn et al., 2016). In diesem Fallbericht wird die AzaT-Behandlung als möglicher Auslöser des sog. Kolitis-assoziierten-Karzinoms diskutiert, dessen zugehörige Zelllinie (HROC69) jedoch in den aktuellen IC_{50}-Bestimmungen keine irreguläre Sensitivität gegenüber diesem Wirkstoff zeigte. Da IBD-Patienten grundsätzlich ein erhöhtes Risiko für diese KRK-Entität aufweisen, ist es schwer zu differenzieren inwiefern eine AzaT-Therapie an dessen Entstehung beteiligt ist. In dieser Patientengruppe kann eine Thiopurintherapie auch vor der Entstehung des Kolitis-assoziierten-Karzinoms schützen (Chapman und Rubin, 2014). Generell ist, abseits der IBD-Behandlung, die Kombinationstherapie AzaT/Cylcosporin A bei organtransplantierten Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein proximales Kolonkarzinom assoziiert (Safaeian et al., 2016). Unabhängig von weiteren, tumorfördernden Mechanismen werden durch AzaT letztendlich CTL gehemmt (Pat Bucy, 1988). Dies könnte selbst bei einer erfolgreichen Induktion der HERV-H den möglichen Co-Kulturansatz beeinträchtigen.

Darüber hinaus bestehen aber auch direkt auf der Toxizität von AzaT basierende Therapieansätze. Neben dem etablierten Einsatz bei der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie ist eine Behandlung solider Tumoren (z.B. Mesotheliom, Pankreaskarzinom), die eine Deletion der Methylthioadenosinphosphorylase vorweisen, denkbar. Dieser Enzymverlust erhöht die Sensitivität gegenüber 6-TG. Die

parallele Gabe des natürlichen Enzymsubstrates Methylthioadenosin erlaubt die Tumorzellselektion mit der Protektion gesunder Zellen und dem Erreichen übersteigerter Zielkonzentrationen in den entarteten Zellen. So konnte beispielsweise in Tumormodellen des neuroendokrinen Prostatakarzinoms eine Wachstumsinhibition erreicht werden (Munshi et al., 2014). Da AzaT nicht in der Lage war HERV-H zu induzieren ist der Einsatz dieses Medikaments in einem CTL-basierten Immunoassay nicht weiter zu verfolgen. Durch die o.g. möglichen tumorfördernden Effekte von AzaT stellt sich außerdem dessen klinischer Einsatz in der Behandlung des KRK, trotz Ansätzen bei anderen soliden Tumoren, als aktuell unwahrscheinlich dar.

4.4.2 Azacitidin

Nachdem lange Zeit vor allem die Reaktivierung von hypermethylierten TSG als Hauptwirkmechanismus der DNMTI angenommen wurde (siehe Kapitel 1.4.3.2), besteht der aktuelle Fokus auf der, teilweise mit einer Reaktivierung von ERV verbundenen, Immunmodulation. Diesen neuartigen Effekten widmen sich neben Chiappinelli und Kollegen auch weitere Gruppen. So wird noch einmal in KRK-Zelllinien die Bedeutung der Induktion retroviraler doppelsträngiger RNA mit finaler IFN-Antwort, sowie die Rolle des vorherigen Reaktionsweges (bestehend aus den mitochondrialen antiviralen Signalproteinen MDA5 und IRF7) betont. Außerdem löst Decitabin besonders in den sog. tumorinitiierenden Zellen des KRK eine effektive Immunantwort aus. Diese teilweise Stammzelleigenschaften-besitzende Subgruppe der Tumorzellen scheint die Entstehung maligner Neoplasien hervorzurufen, gilt als besonders resistent gegenüber klassischen Chemotherapeutika und ist daher ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer Tumorbehandlungen (Roulois et al., 2015).

In dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Hochregulation von HERV-H Loci in KRK-Zelllinien durch eine AzaC-Therapie. Diese Induktion gilt als wichtige Grundlage für die Entstehung eines viralen Mimikrys bzw. die Etablierung der HERV-H als TSA mit entsprechender CTL-Antwort. Durch einige Anpassungen der AzaC-Therapie wäre höchstwahrscheinlich eine gesteigerte Überexpression der HERV-H möglich:

Vor allem scheint eine eher geringe AzaC-Konzentration (c = 0,3 µM) für eine maximale Demethylierung in Zelllinien der akuten myeloischen Leukämie zu sorgen (Hollenbach et al., 2010). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass die signifikante X00041_h_gag Induktion in den untersuchten KRK-Zelllinien nur durch die Behandlung mit der reduzierten, zweithöchsten Konzentration (c = 1/3 IC_{50}) erfolgte. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten sehr hohen IC_{50}-Werte (3,95 µM – 39,20 µM) können offenbar die X00041_h_gag Expression nur eingeschränkt steigern. Darüber hinaus werden Gene des IFN-Reaktionsweges

(z.B. IFN-β1, IRF7) und retroviralen Ursprungs nur zeitlich verzögert hochreguliert. Die Induktion ebendieser erfolgt vor allem am siebten Tag, nach einer dreitägigen Behandlung und sich anschließender viertägiger Pause (Chiappinelli et al., 2017). Des Weiteren wurde anhand der LINE-1 gezeigt, dass KRK-Zelllinien mit geringer Expression repetitiver Elemente sensitiver gegenüber einer Therapie mit AzaC sind (Desai et al., 2017). Obwohl sich diese Hinweise für HERV-H aktuell nicht bestätigen ließen, sollte dieser Aspekt bei der Zelllinienauswahl für zukünftige Analysen beachtet werden.

Allein durch die o.g. immunmodulatorischen Effekte der DNMTI lässt sich ein Synergismus mit bereits etablierten Immuntherapeutika vermuten. Tatsächlich reagierten in einem Mausmodell Melanomzellen nach vorheriger AzaC-Behandlung sensitiver auf eine anti-CTLA-4 Therapie (Chiappinelli et al., 2017). So untersucht beispielweise eine aktuelle Phase-II Studie (NCT022604408 [www.clinicaltrials.gov]) die Kombination AzaC + Pembrolizumab in der Therapie des Chemotherapie-refraktären und metastasierten KRK am Patienten. Auch für die Behandlung des aktuell schlecht immuntherapeutisch beherrschbaren MSS-KRK gibt es diverse Studien, die beispielsweise die Kombination Epacadostat (IDO-1 Inhibitor) + Pembrolizumab + AzaC (NCT02959437 [www.clinicaltrials.gov]) testen. Der Einsatz von DNMTI kann jedoch auch die Expression von Immuncheckpointmolekülen (PD-1, PDL-1, CTLA-4) via Promotordemethylierung induzieren (Yang et al., 2014). Besonders die Hochregulation von PD-1 in den T-Zellen des Myelodysplastischen Syndroms ist eigentlich mit einem schlechteren Therapieansprechen gegenüber den DNMTI, sowie einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert (Ørskov et al., 2015). In der Medikamentenkombination scheint bei der Therapie des KRK jedoch der Schlüssel zum Erfolg zu liegen. So sensitivieren die DNMTI zum einen die Tumorzellen für eine folgende ICI-Therapie und diese wiederum verhindert eine, durch die Induktion der *escape*-Mechanismen hervorgerufene, Resistenz gegenüber den demethylierenden Therapeutika. Eine hohe Expression der Proteine des viralen Mimikrys, z.B. durch AzaC ausgelöst, zeigt nicht nur das o.g. gesteigerte Ansprechen auf eine anti-CTLA-4 Therapie, sondern ist auch mit einer besseren Prognose assoziiert (Chiappinelli et al., 2017). Zwei weitere Möglichkeiten, mit denen die Induktion der HERV und die antivirale Immunantwort gesteigert werden könnten, sind die Kombination der DNMTI mit Vitamin C (Liu et al., 2016) oder dem Histon-Lysin-Methyltransferaseinhibitor G9A (Liu et al., 2018).

Bei einem DNMTI-induzierten *killassay* könnte AzaC nicht nur die nötige Expression der HERV-H steigern, sondern auch über verschiedene Wege die Interaktion mit CTL fördern:

Hierfür ist zum einen die Ausbildung von MHC-I, die in rund 14 % der KRK nicht stattfindet, essenziell. Durch eine Behandlung mit Decitabin kann in Melanomzellen diese Expression wiederhergestellt und somit eine spezifische CTL-Reaktion gegenüber ausgewählten MAGE-Peptiden herbeigeführt werden (Serrano et al., 2001). Als Bestandteile des später definierten Sets der AzaC-induzierten Immungene werden HLA-A, HLA-B, HLA-C auch in KRK-Zelllinien durch eine AzaC-Therapie hochreguliert (Li et al., 2014). Des Weiteren kann durch eine DNA-Hypomethylierung die Expression von Chemokinen gesteigert werden, die als Liganden des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 3 wirken und somit u.a. die Infiltration durch $CD8^+$ T-Lymphozyten steigern können (Groom und Luster, 2011; Peng et al., 2015). Zusammenfassend sind demethylierende Wirkstoffe durch ihre starke Immunogenitätssteigerung von Tumorzellen, die Aktivierung spezifischer CTL und eine Sensitivierung gegenüber ICI vielversprechende Kandidaten für zukünftige Behandlungsstrategien solider Tumoren. Hoffnungsträger sind hierfür auch neue Vertreter der DNMTI, wie beispielsweise RRx-001, mit einem offenbar verbesserten Nebenwirkungsprofil (Zhao et al., 2017).

4.4.3 Valproinsäure

Es lohnt sich auf der Suche nach neuen Ansätzen auch das eng umgrenzte Feld der Tumortherapie zu verlassen. So konnten in Neuroblastomzelllinien durch Valproinsäure (VPS) zwei verschiedene Gruppen der HERV (HERV-W, ERV9) induziert werden. Auch lag bei Schizophreniepatienten mit VPS-Therapie *postmortem* eine erhöhte HERV-W Expression gegenüber der unbehandelten Vergleichsgruppe vor. Als Ursache für diese Hyperexpression wird VPS, neben der eigentlichen antiepileptischen Wirkung auf Ionenkanalbasis, eine Histon-Deacetylase-Inhibition mit epigenetischem Chromatinremodelling zugeschrieben (Diem et al., 2012). Diese epigenetische Dysregulation wird auch als Ursache für die Entstehung der Entwicklungsstörungen und Hirnschäden nach VPS-Anwendung in der Schwangerschaft diskutiert. So konnte in Mausmodellen nach pränataler VPS-Applikation eine Überexpression von ERV über mehrere Generationen in Hirn- und Blutzellen nachgewiesen werden (Tartaglione et al., 2019).

4.5 HERV in Tumordiagnostik und -therapie

4.5.1 Ein neuer Biomarker maligner Neoplasien?

Es besteht zunehmend ein Trend zu individualisierten und tumorspezifischen Behandlungsstrategien. Dieser setzt allerdings die Entdeckung neuer bzw. das verbesserte Verständnis bekannter molekularer Veränderungen und somit möglicher immuntherapeutischer Zielstrukturen (wie z.B. TSA) voraus. HERV bewegen sich in diesem Spannungsfeld zwischen ihren Eigenschaften als virale Strukturen, mit der möglichen Induktion einer Immunantwort, und denen eines klassischen regulatorischen humanen Gens. Somit beeinflussen sie, so vielfältig wie kaum eine andere Struktur, sowohl die Entstehung, als auch die Behandlung von Tumoren.

Biomarker sind Substanzen oder Prozesse, die ein erhöhtes Risiko für eine zukünftige Tumorerkrankung, eine bereits vorhandene maligne Neoplasie oder Besonderheiten bei der Behandlung dieser anzeigen können. Dabei konnten für HERV beim Mammakarzinom bereits Erfolge verzeichnet werden: So ist das HERV-K env-Protein im Tumorgewebe überexprimiert und geht mit einer verstärkten Krankheitsprogression und schlechten Prognose einher (Zhao et al., 2011). Da Patienten mit einem duktalen *carcinoma in situ* oder Mammakarzinom im Frühstadium im Serum vermehrt HERV-K (HML-2) mRNA bzw. AK gegen diese Genstrukturen aufweisen, besteht hier das Potenzial für einen diagnostischen Tumorbiomarker (Wang-Johanning et al., 2014). Im Pankreaskarzinom wurden ebenso eine erhöhte Expression von HERV-K im Tumorgewebe und vermehrt AK im Patientenserum gegen Proteine der HERV-K (env, NP9) beobachtet. Durch ein Ausschalten von env konnte die Tumorzellproliferation signifikant reduziert und somit der Beitrag dieses Proteins zur Tumorgenese unterstrichen werden (Li et al., 2017).

Die Übertragung dieser vielversprechenden Ansätze auf die HERV-H ist ein wichtiger Bestandteil der heutigen Forschung. So konnte aktuell für env der HERV-H, zusammen mit anderen Familien menschlicher Retroviren, eine erhöhte mRNA-Expression in Blutanalysen von Lungenkarzinompatienten beobachtet werden (Zare et al., 2018). Für das KRK wurden in den letzten Jahren, als Alternative zu den etablierten immunochemischen Verfahren, diverse besonders sensitive Stuhltests auf DNA-Basis entwickelt, wofür auch HERV relevante Kandidaten sind (Imperiale et al., 2014). Deren mögliche Bedeutung für diese Form der KRK-Frühdiagnose wird durch die starke Assoziation mit dem Lymphknoten-Metastasierungslevel betont. Außerdem postulierten die Autoren bei der Verwendung der vier meist exprimierten HERV-H Primer eine Sensitivität von 67 %, sowie eine Spezifität von 97 % (Pérot et al., 2015).

4.5.2 HERV als Neoantigene für CTL-Antworten?

Der erste Nachweis dafür, dass HERV-Peptide in Tumorzellen eine CTL-Antwort auslösen können, erfolgte in Melanomzellen. Bei dem zugehörigen Antigen handelt es sich um das Transkript eines streng begrenzten ORF (env) des überexprimierten MEL-Gens der HERV-K (Schiavetti et al., 2002). Später wurde gezeigt, dass auch in Zelllinien des Mamma- und Ovarialkarzinoms spezifische Proteine (env) der HERV-K eine Immunantwort durch CTL auslösen (Rycaj et al., 2015; Wang-Johanning et al., 2008). Außerdem können im klarzelligen Nierenkarzinom überexprimierte Transkripte (CT-RCC-8; CT-RCC-9; CT-RCC-env) der spezifischen HERV-Familie CT-RCC HERV-E ebenso CTL aktivieren (Cherkasova et al., 2016).

In KRK-Zelllinien wurde diese Immunantwort für HERV-H mittels Epitopen des ORF auf dem Xp22.3 Chromosom (= X00041_h_gag) bestätigt. Das tumorsupprimierende Potenzial des entsprechenden *killassays* wurde in geeigneten KRK-Zelllinien (HLA-A2.1$^+$; ORF Xp22.3$^+$) durch eine 40 %ige Lyse aufgezeigt (Mullins und Linnebacher, 2012b). In dem jetzt durchgeführten Immunoscreen wurden aus der erweiterten Tumorbank die Zelllinien HROC18 und HROC309 aufgrund ihrer MHC-I und HLA-A2.1 Trägerschaft als geeignete Vertreter für ein CTL-basiertes Immunoassay identifiziert. Während diese Eigenschaften für HROC309 erstmals beschrieben wurden, stellen sie für HROC18 eine Bestätigung bereits durchgeführter Analysen dar (Maletzki et al., 2015). Durch die gleichmäßige AzaC-induzierte Hochregulation von X00041_h_gag ist die Zelllinie HROC309 trotz niedriger basaler Expression ein interessanter Kandidat für die Co-Kultur mit CTL. Auch wenn für HROC18 keine eindeutige Induktion erfolgte, ist durch die starke basale Ausbildung von X00041_h_gag doch eine deutliche AzaC-unabhängige CTL-Antwort zu erwarten.

Die Definition von immunogenen und auf ERV basierenden Epitopen umfasst nicht nur ein breites Spektrum an HERV-Familien, sondern auch Felder außerhalb der zahlreichen o.g. malignen Neoplasien. Ein aktuelles Beispiel sind diverse, zu env zugehörige, Peptide (W, Q, T) der HERV-W. Diese sind möglicherweise an der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder Schizophrenie beteiligt und können ebenso zu einer CTL-Induktion führen (Tu et al., 2017). Außerdem liegen in HIV$^+$-Zellen diverse HERV-Peptide induziert vor, die als stabile Zielstrukturen CTL aktivieren und somit mögliche Ansatzpunkte für eine HIV-Immuntherapie liefern (Garrison et al., 2007). Insgesamt bestätigen die vielen verschiedenen Versuchsansätze das Potenzial diverser HERV-Familien in verschiedenen Erkrankungsbildern – allen voran den malignen Neoplasien – eine zuverlässige CTL-Zielstruktur darzustellen.

4.5.3 Ausblick und aktuelle Literatur

Nicht nur in der Mikrobiologie, sondern auch in der Tumortherapie stehen Resistenzentwicklungen im Fokus aktueller Forschung. Ausgerechnet auf die vielversprechende *targeted therapy* des KRK, mittels EGFR-Blockade bzw. BRAF-Inhibition, konnte jüngst das Modell der adaptiven Mutation übertragen werden. Wie auch Bakterien entwickeln kolorektale Tumorzellen unter Therapiedruck vorübergehend als *escape*-Mechanismen eine fehleranfällige DNA-Polymerase bzw. MMR-Defekte und demnach eine erhöhte Mutationslast. Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme an MSI. Auch klinisch wurden diese Beobachtungen an KRK-Patienten bestätigt, deren Tumoren unter Chemotherapie mittels FOLFOX (Folinsäure, 5-Fluoruracil, Oxaliplatin) und Panitumumab (anti-EGFR) eine MLH1- und MSH2-Herabregulation aufwiesen. Die Autoren sehen dabei eine Unterdrückung dieser adaptiven Mutationen zur Effizienzsteigerung der *targeted therapy* als primäres Ziel an (Russo et al., 2019).

Die potenzielle mutagene Entstehung neuer Zielstrukturen sollte aber auch als immuntherapeutische Chance begriffen werden. Inwiefern hierbei die, auch mit MSI-H assoziierten, HERV-H vielversprechende Kandidaten darstellen, bleibt aktuell eine interessante Frage für weitere Forschungsansätze. Als Hinweis hierfür gilt die *in vitro* nach Etoposidtherapie beschriebene HERV-Überexpression in chemotherapieresistenten Zellen (Díaz-Carballo et al., 2015).

Dass HERV davon unabhängig schon jetzt zunehmend Bestandteil translationaler Forschung sind, zeigt sich allein quantitativ in den jährlichen HERV-Publikationen, deren Anzahl sich unter primärer Fokussierung auf Tumorerkrankungen ausgehend von ca. 20 (1990) zuletzt auf rund 120 (2017) steigerte. Noch bedeutender ist jedoch der in einem aktuellen Review betonte qualitative Aspekt in Form des stetig zunehmenden Verständnisses der HERV in ihrer Rolle als potenzielle Biomarker oder immunogene Zielstrukturen. Gerade unter chirurgischen Gesichtspunkten betont der Autor den Aufbau von Tumordatenbanken als Schlüsselstelle für weitere Analysen (Grabski et al., 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten anhand einer solchen Tumordatenbank umfangreiche HERV-H *in vitro* Analysen an KRK-Zelllinien durchgeführt werden. Neben dem Screening der basalen RNA- und Proteinexpression und der Identifizierung geeigneter immunogener Zelllinien gelang eine HERV-H Induktion auf RNA-Ebene mittels AzaC-Therapie, sodass ein weiterer Baustein für die Etablierung der HERV in der Tumortherapie des KRK geliefert werden konnte.

5 Zusammenfassung

Retroviren sind seit Millionen von Jahren als vermeintliche „Parasiten“ Bestandteil des menschlichen Genoms und eine Überexpression der HERV-H scheint entweder Ursache oder Folge der KRK-Entstehung zu sein. Mit dem Screeningansatz auf RNA-Ebene (n = 7 für HERV-H spezifische Primer) wurden n = 24 KRK-Zelllinien in drei Expressionsgruppen (niedrig, mittel, hoch) klassifiziert. Anschließend erfolgte die Proteinanalyse mittels n = 5 HERV-H AK. Dabei zeigte der Expressionsvergleich zwischen dem Referenz-AK (14H11G1) und dem Referenzlocus der RNA (X00041_h_gag) keine eindeutige Korrelation. Als primäre Ursache gilt die übersteigerte HERV-Proteinmarkierung in der niedrigen RNA-Expressionsgruppe, bedingt durch die fehlende Locusspezifität des AK. Diese Daten über den basalen Gehalt an HERV-H in den Zelllinien des Patientenpools stellen eine wichtige Basis für weitere Projekte dar. Bei der Tumorbehandlung sind HERV-H potenzielle Zielstrukturen einer Immuntherapie, wofür deren medikamentöse Induktion zentraler Bestandteil dieser Arbeit war. Die Behandlung der n = 7 Zelllinien erfolgte mit je zwei potenziell demethylierenden Medikamenten (AzaT, AzaC) über drei Therapiezeiträume (24; 72 und 2 x 72 h) und zusätzlich zur Kontrolle mit drei verschiedenen, von den IC_{50} abhängigen, Konzentrationen. Für AzaT konnte keine Induktion der HERV-H Loci verzeichnet werden. Demgegenüber steht die insgesamt signifikante Expressionssteigerung durch die AzaC-Therapie über 2 x 72 h. Diese umfasst zwei Loci (X00041_h_gag, 500502_h_L3U3) für die zweithöchste Konzentration (1/3 IC_{50}) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Somit gelang in Zelllinien des KRK die erfolgreiche medikamentöse Induktion von, für HERV-H spezifischen, RNA-Loci. Neben dem Auslösen des viralen Mimikrys steht die Wirkstoffgruppe der DNMTI auch durch die Sensitivierung gegenüber ICI (z.B. Pembrolizumab) im aktuellen Fokus der KRK-Therapie. Mittels einer Anpassung des Versuchsaufbaus (geringere AzaC-Konzentrationen, behandlungsfreies Intervall) ist eine Verstärkung der HERV-Hochregulation zu erwarten. Die immunologische Relevanz dieser Induktion ließe sich zukünftig durch das bereits etablierte, für X00041_h_gag spezifische, *killassay* auf CTL-Basis überprüfen. Als mögliche Kandidaten (MHC-I^+; HLA-$A2.1^+$) wurden hierfür HROC18 und HROC309 identifiziert. Durch ihr immuntherapeutisches Potenzial (z.B. Therapie mittels CAR-T-Zellen, Vakzinierungen) ist die erfolgreiche Expressionssteigerung der HERV in KRK-Zelllinien eine wichtige Grundlage weiterer Analysen, möglicherweise auch mit *in vivo* Ansätzen.

6 Thesen

1. Als Überrest retroviraler Infektionen vor vielen Millionen Jahren spielen HERV heute sowohl bei physiologischen Funktionen (z.B. plazentäre Synzytinverschmelzung), als auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder malignen Neoplasien eine Rolle.

2. Die gesteigerte Expression von Sequenzen der HERV-H Familie ist mit dem Auftreten des KRK assoziiert.

3. Die Untersuchung der basalen HERV-H Expression auf RNA-Ebene mittels *in vitro* Screening ist als Basis für weitere Forschungsansätze wegweisend.

4. Durch ihre starke Expression mit geringer Standardabweichung eignen sich 14H11G1 (Antikörper) und X00041_h_gag (RNA-Primer) ideal als jeweilige Referenzvertreter.

5. Anhand der HERV-H Expressionsmessung auf RNA-Ebene mittels n = 7 spezifischen Primerpaaren können die untersuchten KRK-Zelllinien erstmals in drei Expressionsgruppen (niedrig, mittel, hoch) eingeteilt werden.

6. Die HERV-H Protein-Expression korreliert nicht mit der HERV-H RNA-Expression.

7. Die weiterhin hohe Mortalität des KRK betont die fortbestehende Notwendigkeit der Entwicklung neuer (auch immuntherapeutischer) Behandlungsstrategien für diese Tumorentität, wobei HERV mögliche Zielstrukturen darstellen.

8. Mittels (medikamentöser) DNA-Hypomethylierung können HERV-codierte Sequenzen prinzipiell epigenetisch induziert werden.

9. Durch eine Azathioprintherapie lässt sich HERV-H nicht auf RNA-Ebene induzieren.

10. Die Zelllinie auf Basis eines unter Azathioprintherapie entstandenen Tumors (HROC69) zeigt keine veränderte Sensitivität gegenüber einer erneuten Exposition.

11. Die Therapie mit dem DNMTI Azacitidin ist in der Lage die HERV-H Expression auf RNA-Ebene zu steigern. In der Zusammenfassung aller n = 7 behandelten Zelllinien lässt sich eine signifikante Induktion bei n = 2 Loci (X00041_h_gag, 500502_h_L3U3) nach einer Therapie über 2 x 72 h mit einer Konzentration von 1/3 IC_{50} belegen.

12. Kurze Behandlungsintervalle über 24 oder 72 h mittels Azacitidin verursachen keine HERV-H Induktion.

13. Der Nachweis von membranständig exprimierten MHC-I und HLA-A2.1 identifiziert HROC18 und HROC309 als mögliche Kandidaten für weiterführende immunologische *in vitro* Analysen, wie bspw. ein auf CTL basierendes *killassay*.

A Anhang

A.1 Material & Methoden

Tabelle A.1: *Zelllinien-spezifische Anzahl ausgesäter Zellen pro Kavität (96-Well-Platte).*

Zelllinie	Zellanzahl pro Kavität (96-Well-Platte)
HROC18	15.000
HROC40	10.000
HROC46 T0 M1	10.000
HROC50 T1 M5	5.000
HROC69	15.000
HROC87 T0 M2	15.000
HROC147 T0 M1	10.000
HROC278 T0 M1	8.000
HROC278Met T2 M2	10.000
HROC285 T0 M2	2.000
HROC296	15.000
HROC309	10.000
HROC313Met1 T0 M2	10.000
HROC324	5.000
HROC364	20.000
HROBMC01	5.000

A.2 Ergebnisse

A.2.1 HERV-H Screening

Tabelle A.2: *RE (gemittelt) der n = 7 HERV-H spezifischen Loci aller n = 26 Zelllinien im Rahmen der Screeninguntersuchung. Messung an den initialen, durch die AG MOI bereitgestellten, Passagen der jeweiligen Zelllinien.*

Zelllinie	X00041_ h_gag	2000045 _h_gag	2000045 _h_pol	500502_ h_L3U2	1300360 _h_gag	1300360 _h_env	1400035 _h_gag
HROC18 P38	8,60	0,14	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
HROC24 P33	0,07	0,13	0,00	0,16	0,14	0,00	0,00
HROC24 T1 M1 P30	0,03	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,09
HROC40 P12	0,75	0,03	0,00	0,12	0,06	0,00	0,00
HROC43 P39	0,29	0,29	0,00	0,60	0,24	0,00	0,00
HROC46 T0 M1 P23	4,30	0,24	0,17	2,39	0,00	0,94	0,00
HROC50 T1 M5 P13	0,03	0,18	0,05	0,06	0,16	0,00	0,00
HROC59 T1 M1 P25	0,11	0,00	0,00	0,99	0,00	0,00	0,00
HROC69 P28	1,03	0,09	0,00	0,83	0,00	0,00	0,00
HROC69 T0 M2 P32	0,71	0,02	0,18	1,04	0,00	2,81	0,00
HROC87 T0 M2 P25	9,06	0,09	0,42	0,98	1,15	4,26	0,36
HROC131 T0 M3 P31	2,20	0,18	0,00	0,82	0,00	0,00	0,00
HROC147 T0 M1 P10	1,26	0,40	0,00	8,75	0,27	0,00	0,65
HROC147Met P13	4,72	0,63	1,20	1,31	0,09	0,00	0,08
HROC173 P15	0,53	0,45	0,11	0,21	0,11	1,02	0,13
HROC239 T0 M1 P8	41,86	1,29	0,00	1,73	0,00	0,00	0,00
HROC257 T0 M1 P6	13,24	0,65	7,12	1,57	0,00	0,00	0,06
HROC278 T0 M1 P21	0,14	0,02	0,04	0,03	0,04	0,00	0,03
HROC278Met T2 M2 P22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HROC285 T0 M2 P13	0,57	0,23	0,48	0,74	0,29	3,05	0,22
HROC296 P16	0,01	0,03	0,00	0,04	0,03	0,00	0,04
HROC309 P9	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HROC313Met1 T0 M2 P13	2,25	0,04	0,37	0,36	0,06	0,00	0,07
HROC324 P24	0,51	0,28	0,92	0,48	0,00	0,38	0,00
HROC364 P20	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
HROBMC01 P37	0,06	0,12	0,13	0,19	0,05	0,46	0,03

Tabelle A.3: *Ermittelte Schmelztemperaturen der n = 7 HERV-H spezifischen Primer für die qRT-PCR.*

HERV-H Primer	Schmelztemperatur in °C (gerundet)
X00041_h_gag	84,0
2000045_h_gag	85,5
2000045_h_pol	83,5
500502_h_L3U2	83,0
1300360_h_gag	86,0
1300360_h_env	80,0
1400035_h_gag	84,5

Tabelle A.4: *Durchflusszytometrische Untersuchung der HERV-H Proteinexpression mit n = 6 Färbeansätzen, bestehend aus n = 4 anti-gag AK (1B3H7, 1D7D11, 2H2D6, 14H11G1), sowie der 1. Negativkontrolle (kein primärer AK, nur Puffer P) und der 2. Negativkontrolle (anti-His 2G2B3). Darstellung der passagespezifischen Rohdaten des prozentualen Anteils der markierten Zellen.*

Zelllinie	Puffer P	2G2B3	1B3H7	1D7D11	2H2D6	14H11G1
HROC18 P17	0,70	13,83	51,65	58,70	53,60	81,49
HROC18 P18	0,87	1,37	14,36	5,30	14,31	37,46
HROC18 P19	1,39	2,05	18,56	10,35	14,24	56,73
HROC309 P25	0,82		12,43	3,59	10,49	64,10
HROC309 P28	1,06	0,19	11,70	12,81	2,86	35,70
HROC309 P28	1,10	3,65	53,90	58,18	58,91	68,64
HROC309 P29	1,05	0,95	26,97	22,57	21,46	44,29
HROC40 P32	0,83	1,40	3,45	21,69	9,81	29,54
HROC40 P33		0,55	10,95	2,41	2,87	26,55
HROC285 T0 M2 P35	1,05	1,89	8,55	4,44	6,94	28,13
HROC285 T0 M2 P34	1,06	2,30	22,30	29,44	16,21	52,74
HROC285 T0 M2 P36	0,98	1,58	20,70	27,09	14,68	40,67
HROC69 P38	1,02	0,67	5,86	5,20	10,44	27,89
HROC69 P39	1,14	2,06	10,90	7,81	33,94	41,34
HROC69 P39	1,02	0,49	9,05	8,90	15,09	28,20
HROC278Met T2 M2 P35	1,11	5,94	35,34	38,49	23,33	86,95
HROC278Met T2 M2 P35	1,12	7,12	17,06	68,40	29,58	81,17
HROC364 P28	1,10	3,69	49,07	45,72	52,16	52,95
HROC364 P27	1,12	2,48	18,52	18,34	21,41	35,06
HROC364 P17	1,10	2,96	33,81	21,91	35,51	44,52
HROC46 T0 M1 P34	0,99	5,43	45,64	39,85	45,88	67,73
HROC46 T0 M1 P39	1,07	0,15	5,44	17,39	4,79	51,29
HROC46 T0 M1 P40	1,11	1,16	18,71	16,41	17,08	49,35

Zelllinie	Puffer P	2G2B3	1B3H7	1D7D11	2H2D6	14H11G1
HROC313Met1 T0 M2 P22	1,05	0,59	40,70	33,92	45,45	59,55
HROC313Met1 T0 M2 P23	1,12	1,59	23,62	23,69	48,26	55,04
HROC147 T0 M1 P22	0,90	9,17	49,47	63,77	69,08	73,86
HROC147 T0 M1 P23	1,12	1,47	45,53	50,23	38,04	60,81
HROC50 T1 M5 P42	1,06	3,20	20,94	22,01	17,38	42,55
HROC50 T1 M5 P44	1,10		7,46	8,72	6,46	36,71
HROC87 T0 M2 P32	1.00	2,98	24,37	24,30	14,15	52,47
HROC87 T0 M2 P33	1,09	1,65	19,57	19,93	9,91	47,36
HROC324 P24	1,04	1,82	15,84	9,77	13,73	54,75
HROC324 P28	1,13	0,45	1,87	1,59	1,89	44,31
HROC278 T0 M1 P26	1,08	0,07	1,05	0,63	0,64	11,95
HROC278 T0 M1 P32	1,11	0,56	2,76	7,16	8,07	34,94
HROC278 T0 M1 P37	1,04	0,30	2,37	3,77	3,78	14,87
HROC278 T0 M1 P38	1,09	0,48	7,00	9,22	6,47	29,50
HROBMC01 P31	1,19	1,53	20,53	20,01	14,91	37,93
HROBMC01 P33	1,11	4,50	33,13	32,92	22,99	39,37
HROC296 P14	1,12	2,94	14,78	16,92	3,27	18,89
HROC296 P16	1,09	0,41	1,59	1,54	0,38	21,98

A.2.2 Finale Azathioprinbehandlung

Tabelle A.5: *RE der HERV-H in den n = 7 final ausgewählten Zelllinien nach den jeweiligen finalen AzaT-Behandlungsansätzen und -dauern (siehe linke Spalte).*
Reihenfolge der n = 7 HERV-H Primer:
1 = X00041_h_gag; 2 = 2000045_h_gag; 3 = 2000045_h_pol; 4 = 500502_h_L3U3; 5 = 1300360_h_gag; 6 = 1300360_h_env; 7 = 1400035_h_gag.

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
HROC309							
24 h - K	0,012	0,033	0,000	0,046	0,000	0,000	0,720
24 h - IC_{50}	0,005	0,010	0,000	0,024	0,000	0,000	0,267
24 h - 1/10 IC_{50}	0,003	0,024	0,000	0,031	0,000	0,000	0,424
24 h - 2 µM	0,007	0,047	0,000	0,060	0,000	0,000	0,858
72 h - K	0,006	0,042	0,000	0,038	0,000	0,000	0,752
72 h - IC_{50}	0,007	0,012	0,000	0,051	0,000	0,000	0,215
72 h 1/10 IC_{50}	0,005	0,015	0,000	0,025	0,000	0,000	0,358
72 h - 2 µM	0,006	0,043	0,000	0,045	0,000	0,000	0,856
2 x 72 h - K	0,003	0,024	0,000	0,028	0,000	0,000	0,574
2 x 72 h - IC_{50}	0,014	0,009	0,000	0,015	0,000	0,000	0,285
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,003	0,019	0,000	0,017	0,000	0,000	0,408
2 x 72 h - 2 µM	0,002	0,016	0,000	0,018	0,000	0,000	0,329
HROC278Met T2 M2							
24 h - K	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - IC_{50}	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - 1/10 IC_{50}	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - 2 µM	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - K	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - IC_{50}	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - 1/10 IC_{50}	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - 2 µM	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - K	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - IC_{50}	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - 2 µM	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HROC50 T1 M5							
24 h - K	1,032	0,170	0,000	7,445	0,000	0,000	1,793
24 h - IC_{50}	0,479	0,099	0,000	3,542	0,000	0,000	0,635
24 h - 1/10 IC_{50}	0,076	0,084	0,000	1,266	0,000	0,000	0,237
24 h - 2 µM	0,041	0,062	0,000	0,610	0,000	0,144	0,089
72 h - K	0,052	0,058	0,000	0,779	0,000	0,226	0,099
72 h - IC_{50}	0,137	0,053	0,000	1,688	0,000	0,386	0,177

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
72 h - 1/10 IC_{50}	0,451	0,021	0,000	1,223	0,000	0,437	0,147
72 h - 2 µM	0,096	0,104	0,000	1,947	0,000	0,619	0,248
2 x 72 h - K	0,061	0,073	0,000	0,950	0,000	0,274	0,102
2 x 72 h - IC_{50}	1,296	0,000	0,000	12,161	0,000	0,000	1,012
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,199	0,125	0,000	3,008	0,000	0,000	0,360
2 x 72 h - 2 µM	0,608	0,107	0,000	2,855	0,000	0,000	0,354
HROC324							
24 h - K	0,573	0,410	0,012	0,486	0,012	0,000	0,073
24 h - IC_{50}	0,407	0,558	0,027	0,402	0,009	0,106	0,067
24 h - 1/10 IC_{50}	0,549	0,424	0,037	0,422	0,013	0,078	0,064
24 h - 2 µM	0,398	0,743	0,040	0,408	0,013	0,139	0,063
72 h - K	0,653	0,550	0,020	0,574	0,015	0,257	0,094
72 h - IC_{50}	1,034	0,564	0,050	0,545	0,015	0,110	0,087
72 h - 1/10 IC_{50}	0,788	0,737	0,039	0,755	0,018	0,174	0,115
72 h - 2 µM	0,854	1,179	0,051	1,077	0,030	0,374	0,161
2 x 72 h - K	0,435	0,308	0,065	0,678	0,020	0,321	0,082
2 x 72 h - IC_{50}	1,000	0,434	0,043	0,705	0,015	0,326	0,109
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,609	0,310	0,058	0,516	0,018	0,181	0,077
2 x 72 h - 2 µM	0,884	0,281	0,086	0,759	0,005	0,143	0,117
HROC69							
24 h - K	0,722	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
24 h - IC_{50}	0,717	0,000	0,000	0,004	0,000	0,439	0,013
24 h - 1/10 IC_{50}	0,335	0,000	0,000	0,015	0,000	0,281	0,013
24 h - 2 µM	0,421	0,000	0,000	0,006	0,000	0,328	0,011
72 h - K	0,338	0,000	0,000	0,007	0,000	0,336	0,012
72 h - IC_{50}	0,762	0,000	0,000	0,013	0,000	0,258	0,044
72 h - 1/10 IC_{50}	0,665	0,000	0,000	0,007	0,000	0,709	0,020
72 h - 2 µM	0,904	0,000	0,000	0,050	0,000	1,004	0,029
2 x 72 h - K	0,671	0,000	0,000	0,069	0,000	0,366	0,017
2 x 72 h - IC_{50}	0,809	0,000	0,000	0,035	0,000	0,599	0,028
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,772	0,000	0,000	0,009	0,000	0,607	0,034
2 x 72 h - 2 µM	0,464	0,000	0,000	0,027	0,000	0,177	0,033
HROC18							
24 h - K	2,203	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - IC_{50}	1,604	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000
24 h - 1/10 IC_{50}	1,582	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000
24 h - 2 µM	1,941	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - K	1,244	0,001	0,000	0,002	0,000	0,193	0,000
72 h - IC_{50}	4,882	0,000	0,000	0,015	0,000	0,744	0,000

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
72 h - 1/10 IC_{50}	1,252	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - 2 µM	1,089	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - K	1,415	0,002	0,000	0,008	0,000	0,151	0,000
2 x 72 h - IC_{50}	2,114	0,001	0,000	0,000	0,000	0,155	0,000
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,796	0,001	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - 2 µM	0,767	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HROC87 T0 M2							
24 h - K	1,824	0,041	0,000	1,135	0,000	0,192	0,153
24 h - IC_{50}	3,432	0,051	0,000	0,611	0,000	0,109	0,084
24 h - 1/10 IC_{50}	1,482	0,058	0,000	0,685	0,000	0,152	0,098
24 h - 2 µM	1,282	0,037	0,000	0,571	0,000	0,148	0,091
72 h - K	2,546	0,067	0,007	0,899	0,000	0,190	0,164
72 h - IC_{50}	2,254	0,013	0,007	0,541	0,000	0,124	0,135
72 h - 1/10 IC_{50}	1,188	0,043	0,000	1,081	0,000	0,165	0,105
72 h - 2 µM	1,980	0,070	0,010	1,141	0,000	0,198	0,179
2 x 72 h - K	1,710	0,085	0,017	1,118	0,000	0,217	0,167
2 x 72 h - IC_{50}	1,646	0,024	0,000	0,529	0,000	0,103	0,079
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	1,125	0,036	0,010	0,844	0,000	0,153	0,095
2 x 72 h - 2 µM	1,424	0,027	0,020	1,083	0,000	0,182	0,107

A.2.3 Finale Azacitidinbehandlung

Tabelle A.6: *RE der HERV-H in den n = 7 final ausgewählten Zelllinien nach den jeweiligen finalen AzaC-Behandlungsansätzen und -dauern (siehe linke Spalte).*
Reihenfolge der n = 7 HERV-H Primer:
1 = X00041_h_gag; 2 = 2000045_h_gag; 3 = 2000045_h_pol; 4 = 500502_h_L3U3; 5 = 1300360_h_gag; 6 = 1300360_h_env; 7 = 1400035_h_gag.

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
HROC309							
24 h - K	0,003	0,010	0,007	0,003	0,000	0,000	0,089
24 h - IC_{50}	0,003	0,005	0,000	0,004	0,000	0,000	0,058
24 h - 1/3 IC_{50}	0,006	0,006	0,000	0,004	0,000	0,000	0,053
24 h - 1/10 IC_{50}	0,007	0,008	0,000	0,004	0,000	0,000	0,070
72 h - K	0,004	0,013	0,000	0,005	0,000	0,000	0,103
72 h - IC_{50}	0,007	0,007	0,006	0,006	0,004	0,000	0,061
72 h - 1/3 IC_{50}	0,009	0,008	0,000	0,006	0,000	0,000	0,081
72 h - 1/10 IC_{50}	0,009	0,014	0,000	0,008	0,000	0,000	0,113
2 x 72 h - K	0,002	0,011	0,007	0,003	0,000	0,000	0,094
2 x 72 h - IC_{50}	0,021	0,007	0,004	0,007	0,004	0,000	0,041
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	0,025	0,016	0,021	0,016	0,008	0,000	0,108
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,019	0,014	0,014	0,010	0,000	0,000	0,103
HROC278Met T2 M2							
24 h - K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24 h - 1/3 IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002
24 h - 1/10 IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
72 h - K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 h - IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
72 h - 1/3 IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,002
72 h - 1/10 IC_{50}	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - K	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - IC_{50}	0,010	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	0,005	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
HROC50 T1 M5							
24 h - K	0,016	0,046	0,000	0,095	0,021	0,000	0,019
24 h - IC_{50}	0,019	0,085	0,000	0,105	0,018	0,072	0,013
24 h - 1/3 IC_{50}	0,020	0,136	0,031	0,137	0,033	0,160	0,032
24 h - 1/10 IC_{50}	0,015	0,063	0,008	0,215	0,010	0,148	0,032
72 h - K	0,016	0,078	0,009	0,253	0,014	0,080	0,025
72 h - IC_{50}	0,136	0,073	0,024	0,168	0,015	0,061	0,030

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
72 h - 1/3 IC_{50}	0,111	0,097	0,000	0,225	0,018	0,091	0,027
72 h - 1/10 IC_{50}	0,067	0,096	0,000	0,410	0,026	0,160	0,040
2 x 72 h - K	0,017	0,168	0,055	0,148	0,037	0,201	0,044
2 x 72 h - IC_{50}	0,865	0,092	0,000	0,144	0,044	0,169	0,075
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	0,471	0,097	0,019	0,614	0,026	0,123	0,056
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,217	0,096	0,016	0,455	0,049	0,169	0,049
HROC324							
24 h - K	0,255	0,209	0,000	0,444	0,000	0,134	0,053
24 h - IC_{50}	0,192	0,107	0,000	0,228	0,000	0,073	0,048
24 h - 1/3 IC_{50}	0,208	0,134	0,000	0,364	0,002	0,123	0,052
24 h - 1/10 IC_{50}	0,160	0,132	0,000	0,220	0,001	0,065	0,033
72 h - K	0,191	0,298	0,000	0,278	0,000	0,103	0,070
72 h - IC_{50}	0,346	0,159	0,000	0,378	0,000	0,174	0,062
72 h - 1/3 IC_{50}	0,273	0,184	0,000	0,386	0,000	0,101	0,058
72 h - 1/10 IC_{50}	0,460	0,466	0,000	0,825	0,000	0,357	0,148
2 x 72 h - K	0,293	0,388	0,000	0,518	0,000	0,229	0,110
2 x 72 h - IC_{50}	1,107	0,140	0,000	0,968	0,000	0,147	0,082
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	0,816	0,323	0,000	0,807	0,000	0,193	0,116
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	0,300	0,233	0,000	0,367	0,000	0,137	0,068
HROC69							
24 h - K	0,440	0,010	0,001	0,283	0,000	0,200	0,024
24 h - IC_{50}	0,323	0,005	0,000	0,258	0,000	0,139	0,013
24 h - 1/3 IC_{50}	0,430	0,010	0,001	0,223	0,000	0,183	0,019
24 h - 1/10 IC_{50}	0,418	0,014	0,000	0,331	0,000	0,348	0,022
72 h - K	0,695	0,017	0,000	0,441	0,000	0,342	0,025
72 h - IC_{50}	0,688	0,014	0,002	0,525	0,000	0,516	0,034
72 h - 1/3 IC_{50}	0,680	0,014	0,000	0,455	0,000	0,289	0,028
72 h - 1/10 IC_{50}	0,651	0,013	0,000	0,550	0,000	0,245	0,024
2 x 72 h - K	0,692	0,018	0,002	0,571	0,000	0,626	0,032
2 x 72 h - IC_{50}	0,467	0,015	0,000	0,390	0,000	0,284	0,018
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	1,443	0,031	0,004	0,708	0,000	0,646	0,060
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	1,020	0,021	0,004	0,549	0,000	0,625	0,037
HROC18							
24 h - K	1,724	0,007	0,000	0,021	0,004	0,016	0,006
24 h - IC_{50}	0,926	0,007	0,000	0,022	0,002	0,027	0,004
24 h - 1/3 IC_{50}	0,833	0,009	0,000	0,040	0,004	0,037	0,004
24 h - 1/10 IC_{50}	1,223	0,014	0,000	0,083	0,002	0,064	0,006
72 h - K	1,215	0,013	0,000	0,083	0,006	0,054	0,005
72 h - IC_{50}	1,156	0,015	0,000	0,088	0,006	0,047	0,005

Therapieansatz	1	2	3	4	5	6	7
72 h - 1/3 IC_{50}	1,252	0,014	0,000	0,102	0,000	0,052	0,006
72 h - 1/10 IC_{50}	1,426	0,022	0,006	0,089	0,003	0,099	0,008
2 x 72 h - K	2,098	0,032	0,004	0,093	0,004	0,158	0,009
2 x 72 h - IC_{50}	2,638	0,038	0,002	0,101	0,008	0,267	0,010
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	2,055	0,035	0,003	0,131	0,007	0,176	0,010
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	1,907	0,030	0,000	0,094	0,004	0,145	0,009
HROC87 T0 M2							
24 h - K	5,306	0,118	0,004	0,230	0,066	0,126	0,061
24 h - IC_{50}	3,267	0,119	0,027	0,283	0,070	0,280	0,040
24 h - 1/3 IC_{50}	2,062	0,099	0,023	0,280	0,056	0,115	0,038
24 h - 1/10 IC_{50}	2,845	0,131	0,015	0,219	0,050	0,129	0,059
72 h - K	2,700	0,203	0,034	0,259	0,054	0,134	0,050
72 h - IC_{50}	3,195	0,128	0,010	0,274	0,036	0,096	0,051
72 h - 1/3 IC_{50}	6,053	0,216	0,048	0,300	0,067	0,217	0,055
72 h - 1/10 IC_{50}	2,898	0,156	0,047	0,269	0,049	0,203	0,053
2 x 72 h - K	2,409	0,205	0,340	0,329	0,063	0,304	0,080
2 x 72 h - IC_{50}	6,160	0,149	0,047	0,363	0,046	0,105	0,062
2 x 72 h - 1/3 IC_{50}	3,719	0,191	0,056	0,533	0,068	0,200	0,077
2 x 72 h - 1/10 IC_{50}	3,168	0,263	0,131	0,496	0,063	0,240	0,098

Abkürzungsverzeichnis

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden übliche chemische Formeln, allgemeingültige (im Duden gelistete) Abkürzungen und in Deutschland gesetzliche Einheiten verwendet. Wo bei englischsprachigen Abkürzungen gängige deutsche Übersetzungen bestehen wurden diese angegeben.

5mC	Cytosin mit Methylgruppe am C5-Atom des Pyrimidinrings
6-MP	6-Mercaptopurin
6-TG	6-Thioguanin
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
AT	Österreich
AzaC	Azacitidin
AzaT	Azathioprin
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein
bp	Basenpaare
c	Konzentration
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	engl.: *Cluster of differentiation*
CDKN1B	engl.: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
cDNA	Komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CH	Schweiz
Chr.	Chromosom
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp
CIN	Chromosomale Instabilität
c-myc	Zelluläre Myelocytomatosis
COX2	Cyclooxygenase-2
CpG	Cytosin/Guanin
c-src	Zelluläre Sarkom-Tyrosinkinase
CSF1R	Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor

Ct	engl.: *Treshold cycle*
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	Zytotoxische T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4
D	Zellanzahl pro Milliliter
DC	Dendritische Zellen
DCC	engl.: *Deleted in colorectal cancer*
DE	Deutschland
DK	Dänemark
DMEM	engl.: *Dulbecco`s modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTI	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DNPS	*De novo* Purinsynthese
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	engl.: *Epidermal growth factor receptor* (Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors)
engl.	Englisch
env	engl.: *Envelope gene* (Hüllgen)
ERV	Endogene Retroviren
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOLFOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Oxaliplatin
FR	Frankreich
FSC	engl.: *Forward scatter* (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GSDML	engl.: *Gasdermin-like*
-H	engl.: *High* (Hoch)

HERV	Humane endogene Retroviren
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HROBMC	Tumorzelllinie: „Rostock, engl.: *brain metastasis* (Hirnmetastase), Kolon“
HROC	Tumorzelllinie: „Rostock, Kolon“
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus 1
IBD	engl.: *Inflammatory bowel disease* (chronisch-entzündliche Darmerkrankung)
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	Immuncheckpointinhibitor
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IGF	engl.: *Insulin-like growth factor* (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF-IIR	engl.: *Insulin-like growth factor 2 receptor* (Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 2)
IFN-β	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
IT	Italien
J	Jahre
K	Kontrolle
KRAS	Kirsten ras
KRK	Kolorektales Karzinom
KV	Kristallviolett
-L	engl.: *Low* (Niedrig)
LINE-1	engl.: *Long interspersed nuclear elements 1*
LOH	engl.: *Loss of heterozygosity* (Heterozygotieverlust)
LTR	engl.: *Long terminal repeat*
M	Mauskennzeichnung der Zelllinie
MAGE	Melanomantigen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDA5	engl.: *Melanoma differentiation antigen 5* (Melanom-Differenzierungsantigen 5)
Met	Metastase
MHC	engl.: *Major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)

MLH1	MutL Escherichia Coli homolog 1
MMR	DNA-Mismatch-Reparatursystem
MOI	Molekulare Onkologie und Immuntherapie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSH	MutS homolog
MSS	Mikrosatelliten-stabil
n	Anzahl
N	Anzahl vitaler Zellen
NL	Niederlande
ORF	engl.: *Open reading frame* (offenes Leseraster)
PBS	Primer-Bindungsstelle
PBS	engl.: *Phosphat buffered saline*
PCR	engl.: *Polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PD-1	engl.: *Programmed death receptor 1*
PDL-1	PD-1 Ligand
PDX	engl.: *Patient derived xenograft*
PE	Phycoerythrin
PL	Polen
pol	DNA-Polymerase-Gen
PP	Polypropylen
Q	Anzahl ausgezählter Großquadrate
qRT-PCR	engl.: Q*uantitative real-time PCR*
Rac1	engl.: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
RE	Relative Expression
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SA	engl.: *Splice acceptor*
SD	engl.: *Splice donor*
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek.	Sekundär
SMAD	engl.: *Small mothers against decapentaplegic homolog*

spSTD	Sporadisch, standard (klassisches CIN^+ KRK)
SSC	engl.: *Sideward scatter* (Seitwärtsstreulicht)
T	Transferzahl
T_m	Annealingtemperatur
T_{reg}	Regulatorische T-Zellen
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCF-4	T-Zell Faktor 4
TGF-β	engl.: *Transforming growth factor beta* (Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TGF-βRII	engl.: *Transforming growth factor beta receptor 2* (Rezeptor 2 des transformierenden Wachstumsfaktors beta)
TLR3	engl.: *Toll-like receptor 3*
TPMT	Thiopurin-S-Methyltransferase
tRNA	Transfer-RNA
TSA	Tumorspezifisches Antigen
TSG	Tumorsuppressorgen
UV	Ultraviolett
V_f	Verdünnungsfaktor
VEGF	engl.: *Vascular endothelial growth factor* (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
v.l.n.r.	Von links nach rechts
v-myc	Virale Myelocytomatosis
VPS	Valproinsäure
v-src	Virale Sarkom-Tyrosinkinase
wnt-1	engl.: *Wingless int-1*
ZAF	Südafrika

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Altersstandardisierte und nach Geschlecht sortierte Erkrankungs- und Sterberaten des KRK in Deutschland. **1**

Abbildung 1.2: Charakterisierung der molekularen Hauptentstehungsmechanismen des KRK. **5**

Abbildung 1.3: Struktur retroviraler Proviren: (a) Infektiöse Retroviren mit vollständiger Struktur (b) HERV mit inaktivierenden Mutationen wie z.B. Punktmutationen oder als einzelne LTR durch homologe Rekombination. **8**

Abbildung 1.4: Übersicht über die mehrstufigen HERV-H *in vitro* Analysen in dieser Arbeit. **16**

Abbildung 2.1: Belegung der zwei verschiedenen 12-Well-Platten (AzaT, AzaC) bei finaler Behandlung. **30**

Abbildung 2.2: Pipettierschema für die extrazelluläre Färbung der immunologischen Oberflächenproteine im Rahmen der Durchflusszytometrie. **32**

Abbildung 2.3: Einstellungen und Auswertung der Durchflusszytometrie. **33**

Abbildung 3.1: Wachstumsverhalten der Zelllinien HROC147 T0 M1 und HROC285 T0 M2. **35**

Abbildung 3.2: Wachstumsverhalten der Zelllinien HROC87 T0 M2 und HROC50 T1 M5. **35**

Abbildung 3.3: Wachstumsverhalten der Zelllinie HROC324. **35**

Abbildung 3.4: RE der n = 7 HERV-H spezifischen Loci aller n = 26 Zelllinien im Rahmen der Screeninguntersuchung. **37**

Abbildung 3.5: Nach Gruppenzugehörigkeit sortierte RE der n = 7 HERV-H spezifischen Loci in n = 24 Zelllinien (es fehlen HROC69 und HROC69 T0 M2) des HERV-H RNA-Screenings. **38**

Abbildung 3.6: HERV-H Proteinexpression (14H11G1 AK) in n = 5 Vertretern der niedrig exprimierenden Gruppe. **40**

Abbildung 3.7: HERV-H Proteinexpression (14H11G1 AK) in n = 6 Vertretern der mittleren Expressionsgruppe (+HROC69). **40**

Abbildung 3.8: HERV-H Proteinexpression (14H11G1 AK) in n = 5 Vertretern der hoch exprimierenden Gruppe. **40**

Abbildung 3.9: Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung des 14H11G1 AK gegenüber den Kontrollantikörpern für die niedrig exprimierenden Zelllinien (HROBMC01, HROC278Met T2 M2, HROC296, HROC309, HROC364). **41**

Abbildung 3.10: Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung des 14H11G1 AK gegenüber den Kontrollantikörpern für die mittel exprimierenden Zelllinien (HROC40, HROC50 T1 M5, HROC69, HROC278 T0 M1, HROC285 T0 M2, HROC324). **42**

Abbildung 3.11: Exemplarische Darstellung je einer HERV-H Expressionsmessung des 14H11G1 AK gegenüber den Kontrollantikörpern für die hoch exprimierenden Zelllinien (HROC18, HROC46 T0 M1, HROC87 T0 M2, HROC147 T0 M1, HROC313Met1 T0 M2). **43**

Abbildung 3.12: Vergleich HERV-H Expression auf RNA- (X00041_h_gag Locus) und Proteinebene (14H11G1 AK). **44**

Abbildung 3.13: Überlebenskurven der niedrigen Expressionsgruppe (HROC309, HROC278Met T2 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **46**

Abbildung 3.14: Überlebenskurven der mittleren Expressionsgruppe (HROC50 T1 M5, HROC324, HROC69) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **46**

Abbildung 3.15: Überlebenskurven für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC46 T0 M1, HROC18, HROC313Met1 T0 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **46**

Abbildung 3.16: Überlebenskurven für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC147 T0 M1, HROC87 T0 M2) nach AzaT-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **46**

Abbildung 3.17: IC_{50}-Werte der n = 10 untersuchten Zelllinien nach 2 x 72 h AzaT-Behandlung (Zusammenfassung). **47**

Abbildung 3.18: Überlebenskurven für Vertreter der niedrigen Expressionsgruppe (HROBMC01, HROC278Met T2 M2) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **48**

Abbildung 3.19: Überlebenskurven für Vertreter der niedrigen Expressionsgruppe (HROC364, HROC309) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **48**

Abbildung 3.20: Überlebenskurven für Vertreter der mittleren Expressionsgruppe (HROC285 T0 M2, HROC324) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **49**

Abbildung 3.21: Überlebenskurven für Vertreter der mittleren Expressionsgruppe (HROC50 T1 M5, HROC278 T0 M1, HROC69) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **49**

Abbildung 3.22: Überlebenskurven für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC18, HROC46 T0 M1, HROC147 T0 M1) nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **49**

Abbildung 3.23: Überlebenskurven für Vertreter der hohen Expressionsgruppe (HROC313Met1 T0 M2, HROC87 T0 M2) mit je n = 2 Passagen nach AzaC-Behandlungen über 2 x 72 h im Rahmen der IC_{50}-Bestimmung. **49**

Abbildung 3.24: IC_{50}-Werte der n = 14 untersuchten Zelllinien nach 2 x 72 h AzaC-Behandlung (Zusammenfassung). **50**

Abbildung 3.25: RE des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach finaler AzaT-Therapie über 24, 72 & 2 x 72 h. **52**

Abbildung 3.26: RE des 2000045_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach finaler AzaT-Therapie über 24, 72 & 2 x 72 h. **52**

Abbildung 3.27: RE des 1300360_h_env Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach finaler AzaT-Therapie über 24, 72 & 2 x 72 h. **54**

Abbildung 3.28: RE des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach finaler AzaT-Therapie über 24, 72 & 2 x 72 h. **54**

Abbildung 3.29: RE des 500502_h_L3U3 Locus in der Zelllinie HROC87 T0 M2 nach finaler AzaT-Therapie über 24, 72 & 2 x 72 h. **54**

Abbildung 3.30: RE des X00041_h_gag Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach einer AzaT-Behandlung über 2 x 72 h (Zusammenfassung). **55**

Abbildung 3.31: RE des 1400035_h_gag Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach einer AzaT-Behandlung über 2 x 72 h (Zusammenfassung). **55**

Abbildung 3.32: Wachstumsmorphologie der Zelllinie HROC278 T0 M1 nach Behandlung mit AzaC für 2 x 72 h. **56**

Abbildung 3.33: KV-Absorption (Zellvitalität) aller n = 7 finalen Zelllinien nach einer AzaC-Behandlung über 2 x 72 h (Zusammenfassung). **57**

Abbildung 3.34: RE des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC278Met T2 M2 nach finaler AzaC-Therapie über 2 x 72 h. **58**

Abbildung 3.35: RE des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach finaler AzaC-Therapie über 72 & 2 x 72 h. **59**

Abbildung 3.36: RE des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC309 nach finaler AzaC-Therapie über 2 x 72 h. **59**

Abbildung 3.37: RE des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC50 T1 M5 nach finaler AzaC-Therapie über 72 & 2 x 72 h. **60**

Abbildung 3.38: RE des 1400035_h_gag Locus in der Zelllinie HROC50 T1 M5 nach finaler AzaC-Therapie über 2 x 72 h. **60**

Abbildung 3.39: RE des X00041_h_gag Locus in der Zelllinie HROC324 nach finaler AzaC-Therapie über 2 x 72 h. **61**

Abbildung 3.40: RE des X00041_h_gag Locus in den Zelllinien HROC18 und HROC87 T0 M2 nach finaler AzaC-Therapie über 72 & 2 x 72 h. **62**

Abbildung 3.41: Zusammenfassung *(heatmap)* der prozentualen Veränderung der RE gegenüber der Kontrolle für die n = 7 untersuchten HERV-H Primer nach den n = 3 AzaC-Therapieansätzen über 2 x 72 h in den n = 7 finalen Zelllinien. **63**

Abbildung 3.42: RE des X00041_h_gag Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach einer AzaC-Behandlung über 2 x 72 h (Zusammenfassung). **64**

Abbildung 3.43: RE des 500502_h_L3U3 Locus aller n = 7 finalen Zelllinien nach einer AzaC-Behandlung über 2 x 72 h (Zusammenfassung). **64**

Abbildung 4.1: Immunsuppressive Mechanismen des KRK. **69**

Abbildung 4.2: Analyse der n = 24 im Screening klassifizierten Zelllinien nach ihrem Mikrosatellitenstatus. **74**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Zusammenhang zwischen der Expression spezifischer HERV-Familien und bestimmten malignen Neoplasien. **10**

Tabelle 2.1: Charakterisierung der verwendeten KRK-Zelllinien aus der AG MOI. **22**

Tabelle 2.2: Mastermix der cDNA-Synthese. **27**

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten für GAPDH und HERV-H spezifischen Primer. **28**

Tabelle 2.4: Mastermix jeweils für HERV-H und GAPDH-Primer im Rahmen der qRT-PCR. **28**

Tabelle 2.5: Finale Konzentrationen beider Medikamente (AzaT, AzaC) zur IC_{50}-Bestimmung. **30**

Tabelle 3.1: Klassifikation von n = 24 Zelllinien des HERV-H RNA-Screenings nach Grad der RE. **38**

Tabelle 3.2: Oberflächenexpression der Leukozytenantigene MHC-I (HLA-A/-B/-C), MHC-II (HLA-DP/-DR) und HLA-A2.1 in den n = 7 final behandelten Zelllinien. **65**

Tabelle A.1: Zelllinienspezifische Anzahl ausgesäter Zellen pro Kavität. **86**

Tabelle A.2: RE (gemittelt) der n = 7 für HERV-H spezifischen Loci aller n = 26 Zelllinien im Rahmen der Screeninguntersuchung. **87**

Tabelle A.3: Ermittelte Schmelztemperaturen der n = 7 HERV-H spezifischen Primer für die qRT-PCR. **88**

Tabelle A.4: Gesamte Darstellung der HERV-H Proteinexpression mit allen n = 6 durchflusszytometrischen Färbeansätzen. **88**

Tabelle A.5: RE (alle n = 7 Primer) der HERV-H in den n = 7 final ausgewählten Zelllinien nach allen finalen n = 4 AzaT-Behandlungsansätzen und n = 3 Therapiedauern. **90**

Tabelle A.6: RE (alle n = 7 Primer) der HERV-H in den n = 7 final ausgewählten Zelllinien nach allen finalen n = 4 AzaC-Behandlungsansätzen und n = 3 Therapiedauern. **93**

Literaturverzeichnis

Ahn, K., Kim, H.-S., 2009. Structural and quantitative expression analyses of HERV gene family in human tissues. Mol. Cells 28, 99–103. https://doi.org/10.1007/s10059-009-0107-y

Akiyama, Y., Iwanaga, R., Ishikawa, T., Sakamoto, K., Nishi, N., Nihei, Z., Iwama, T., Saitoh, K., Yuasa, Y., 1996. Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene are strongly related to sporadic proximal colon carcinomas with microsatellite instability. Cancer 78, 2478–2484.

Alao, J.P., 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Mol. Cancer 6, 24. https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-24

Alitalo, K., Bishop, J.M., Smith, D.H., Chen, E.Y., Colby, W.W., Levinson, A.D., 1983. Nucleotide sequence to the v-myc oncogene of avian retrovirus MC29. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80, 100–104.

Azad, N.S., el-Khoueiry, A., Yin, J., Oberg, A.L., Flynn, P., Adkins, D., Sharma, A., Weisenberger, D.J., Brown, T., Medvari, P., Jones, P.A., Easwaran, H., Kamel, I., Bahary, N., Kim, G., Picus, J., Pitot, H.C., Erlichman, C., Donehower, R., Shen, H., Laird, P.W., Piekarz, R., Baylin, S., Ahuja, N., 2017. Combination epigenetic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC) with subcutaneous 5-azacitidine and entinostat: a phase 2 consortium/stand Up 2 cancer study. Oncotarget 8, 35326–35338. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15108

Azimi, F., Jafariyan, M., Khatami, S., Mortazavi, Y., Azad, M., 2014. Assessment of Thiopurine–based drugs according to Thiopurine S-methyltransferase genotype in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. Iran. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 4, 32–38.

Babaian, A., Romanish, M.T., Gagnier, L., Kuo, L.Y., Karimi, M.M., Steidl, C., Mager, D.L., 2016. Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. Oncogene 35, 2542–2546. https://doi.org/10.1038/onc.2015.308

Bailie, L., Loughrey, M.B., Coleman, H.G., 2017. Lifestyle Risk Factors for Serrated Colorectal Polyps: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology 152, 92–104. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.003

Barnes, B., Kraywinkel, K., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A., Wolf, U., 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin.

Barras, D., 2015. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. Biomark. Cancer 7, 9–12. https://doi.org/10.4137/BIC.S25248

Baylin, S.B., 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2, S4–S11. https://doi.org/10.1038/ncponc0354

Bhardwaj, N., Coffin, J.M., 2014. Endogenous Retroviruses and Human Cancer: Is There Anything to the Rumors? Cell Host Microbe 15, 255–259. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.013

Blaise, S., de Parseval, N., Bénit, L., Heidmann, T., 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 13013–13018. https://doi.org/10.1073/pnas.2132646100

Boland, C.R., Goel, A., 2010. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Gastroenterology, Colon Cancer: An Update and Future Directions 138, 2073-2087.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufl, M., Arrieta, O., Burgio, M.A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D.E., Gettinger, S.N., Rudin, C.M., Rizvi, N., Crinò, L., Blumenschein, G.R., Antonia, S.J., Dorange, C., Harbison, C.T., Finckenstein, F.G., Brahmer, J.R., 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer. N. Engl. J. Med. 373, 1627–1639. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643

Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., 2008. Cigarette Smoking and Adenomatous Polyps: A Meta-analysis. Gastroenterology 134, 388-395.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.007

Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H.G., Göbel, G., Margreiter, R., Königsrainer, A., Fuchs, D., Amberger, A., 2006. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 12, 1144–1151. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1966

Bräunlein, E., Krackhardt, A.M., 2017. Identification and Characterization of Neoantigens As Well As Respective Immune Responses in Cancer Patients. Front. Immunol. 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01702

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. Cancer J. Clin. 68, 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Brenner, H., Kloor, M., Pox, C.P., 2014. Colorectal cancer. The Lancet 383, 1490–1502. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9

Büscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., Denner, J., 2005. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. Cancer Res. 65, 4172–4180. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2983

Callahan, R., Drohan, W., Tronick, S., Schlom, J., 1982. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79, 5503–5507.

Campbell, I.M., Gambin, T., Dittwald, P., Beck, C.R., Shuvarikov, A., Hixson, P., Patel, A., Gambin, A., Shaw, C.A., Rosenfeld, J.A., Stankiewicz, P., 2014. Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination. BMC Biol. 12. https://doi.org/10.1186/s12915-014-0074-4

Chapman, C.G., Rubin, D.T., 2014. The Potential for Medical Therapy to Reduce the Risk of Colorectal Cancer and to Optimize Surveillance in Inflammatory Bowel Disease. Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. 24, 353–365. https://doi.org/10.1016/j.giec.2014.03.008

Cherkasova, E., Scrivani, C., Doh, S., Weisman, Q., Takahashi, Y., Harashima, N., Yokoyama, H., Srinivasan, R., Linehan, W.M., Lerman, M.I., Childs, R.W., 2016. Detection of an Immunogenic HERV-E Envelope with Selective Expression in Clear Cell Kidney Cancer. Cancer Res. 76, 2177–2185. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3139

Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O.M., Chan, W.-Y., 2009. DNA Methylation of Cancer Genome. Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev. 87, 335–350. https://doi.org/10.1002/bdrc.20163

Chiappinelli, K.B., Strissel, P.L., Desrichard, A., Li, H., Henke, C., Akman, B., Hein, A., Rote, N.S., Cope, L.M., Snyder, A., Makarov, V., Budhu, S., Slamon, D.J., Wolchok, J.D., Pardoll, D.M., Beckmann, M.W., Zahnow, C.A., Merghoub, T., Chan, T.A., Baylin, S.B., Strick, R., 2017. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. Cell 169, 361. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.036

Cho, E., Lee, J.E., Rimm, E.B., Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., 2012. Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer1234. Am. J. Clin. Nutr. 95, 413–419. https://doi.org/10.3945/ajcn.111.022145

Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Holmberg, L., Kim, D.-H., Malila, N., Miller, A.B., Pietinen, P., Rohan, T.E., Sellers, T.A., Speizer, F.E., Willett, W.C., Wolk, A., Hunter, D.J., 2004. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. Ann. Intern. Med. 140, 603–613.

Christensen, T., 2017. Human endogenous retroviruses in the aetiology of MS. Acta Neurol. Scand. 136 Suppl 201, 18–21. https://doi.org/10.1111/ane.12836

Christman, J.K., 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2′-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene 21, 5483–5495. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699

Clayton, P.E., Banerjee, I., Murray, P.G., Renehan, A.G., 2011. Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. Nat. Rev. Endocrinol. 7, 11–24. https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.171

Cohen, M., Larsson, E., 1988. Human endogenous retroviruses. BioEssays 9, 191–196. https://doi.org/10.1002/bies.950090603

Correale, P., Botta, C., Rotundo, M.S., Guglielmo, A., Conca, R., Licchetta, A., Pastina, P., Bestoso, E., Ciliberto, D., Cusi, M.G., Fioravanti, A., Guidelli, G.M., Bianco, M.T., Misso, G., Martino, E., Caraglia, M., Tassone, P., Mini, E., Mantovani, G., Ridolfi, R., Pirtoli, L., Tagliaferri, P., 2014. Gemcitabine, oxaliplatin, levofolinate, 5-fluorouracil, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-2 (GOLFIG) versus FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients: the GOLFIG-2 multicentric open-label randomized phase III trial. J. Immunother. Hagerstown Md 1997 37, 26–35. https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000004

Cuffari, C., 2006. A Physician's Guide to Azathioprine Metabolite Testing. Gastroenterol. Hepatol. 2, 58–63.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., Croce, C.M., 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7824–7827.

De Luca, J.F., Lee, Y.S., Johnson, D., 2012. Inflammatory Bowel Disease Treatment and Non-melanoma Skin Cancer: A Case Report. Hawaii J. Med. Public Health 71, 324–325.

de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J.-F., Benit, L., Heidmann, T., 2003. Survey of Human Genes of Retroviral Origin: Identification and Transcriptome of the Genes with Coding Capacity for Complete Envelope Proteins. J. Virol. 77, 10414–10422. https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10414-10422.2003

Dean, L., 2012. Azathioprine Therapy and TPMT Genotype, in: Pratt, V., McLeod, H., Rubinstein, W., Dean, L., Malheiro, A. (Eds.), Medical Genetics Summaries. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Denne, M., Sauter, M., Armbruester, V., Licht, J.D., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2007. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. J. Virol. 81, 5607–5616. https://doi.org/10.1128/JVI.02771-06

Depil, S., Roche, C., Dussart, P., Prin, L., 2002. Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. Leukemia 16, 254. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402355

Derissen, E.J.B., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2013. Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine. The Oncologist 18, 619–624. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0465

Desai, N., Sajed, D., Arora, K.S., Solovyov, A., Rajurkar, M., Bledsoe, J.R., Sil, S., Amri, R., Tai, E., MacKenzie, O.C., Mino-Kenudson, M., Aryee, M.J., Ferrone, C.R., Berger, D.L., Rivera, M.N., Greenbaum, B.D., Deshpande, V., Ting, D.T., 2017. Diverse repetitive element RNA expression defines epigenetic and immunologic features of colon cancer. JCI Insight 2. https://doi.org/10.1172/jci.insight.91078

Díaz-Carballo, D., Acikelli, A.H., Klein, J., Jastrow, H., Dammann, P., Wyganowski, T., Guemues, C., Gustmann, S., Bardenheuer, W., Malak, S., Tefett, N.S., Khosrawipour, V., Giger-Pabst, U., Tannapfel, A., Strumberg, D., 2015. Therapeutic potential of antiviral drugs targeting chemorefractory colorectal adenocarcinoma cells overexpressing endogenous retroviral elements. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR 34. https://doi.org/10.1186/s13046-015-0199-5

Diem, O., Schäffner, M., Seifarth, W., Leib-Mösch, C., 2012. Influence of Antipsychotic Drugs on Human Endogenous Retrovirus (HERV) Transcription in Brain Cells. PLoS ONE 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030054

Dudley, J.P., Mertz, J.A., Bhadra, S., Palmarini, M., Kozak, C.A., 2010. Endogenous Retroviruses and Cancer, in: Dudley, J. (Ed.), Retroviruses and Insights into Cancer. Springer New York, New York, NY, pp. 119–162. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09581-3_5

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat. Immunol. 3, 991–998. https://doi.org/10.1038/ni1102-991

D'Urso, A., Brickner, J.H., 2014. Mechanisms of epigenetic memory. Trends Genet. TIG 30, 230–236. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.004

Duval, A., Hamelin, R., 2002. Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers: Toward a New Concept of Target Genes for Instability. Cancer Res. 62, 2447–2454.

Edlich, R.F., Arnette, J.A., Williams, F.M., 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). J. Emerg. Med. 18, 109–119. https://doi.org/10.1016/S0736-4679(99)00173-0

Efeyan, A., Serrano, M., 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. Cell Cycle Georget. Tex 6, 1006–1010. https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4211

Ehrlich, M., 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. Oncogene 21, 5400–5413. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205651

Emambux, S., Tachon, G., Junca, A., Tougeron, D., 2018. Results and challenges of immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer. Expert Opin. Biol. Ther. 18, 561–573. https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1445222

Esteller, M., 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene 21, 5427–5440. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600

Esteller, M., Herman, J.G., 2001. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J. Pathol. 196, 1–7. https://doi.org/10.1002/path.1024

Evans, C., Dalgleish, A.G., Kumar, D., 2006. Review article: immune suppression and colorectal cancer. Aliment. Pharmacol. Ther. 24, 1163–1177. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03075.x

Fearon, E.R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. 6, 479–507. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235

Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759–767. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I

Feinberg, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Ehrlich, M., 1988. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. Cancer Res. 48, 1159–1161.

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. Cold Spring Harb. Protoc. 2016, pdb.prot087379. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379

Feschotte, C., Gilbert, C., 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. Nat. Rev. Genet. 13, 283. https://doi.org/10.1038/nrg3199

Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., Mehlen, P., 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 3416–3421. https://doi.org/10.1073/pnas.051378298

Friedenreich, C., Norat, T., Steindorf, K., Boutron-Ruault, M.-C., Pischon, T., Mazuir, M., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Bergman, M., Johnsen, N.F., Tjønneland, A., Overvad, K., Mendez, M., Quirós, J.R., Martinez, C., Dorronsoro, M., Navarro, C., Gurrea, A.B., Bingham, S., Khaw, K.-T., Allen, N., Key, T., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Orfanou, N., Krogh, V., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Monninkhof, E., Berglund, G., Manjer, J., Ferrari, P., Slimani, N., Kaaks, R., Riboli, E., 2006. Physical Activity and Risk of Colon and Rectal Cancers: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Cancer Epidemiol. Prev. Biomark. 15, 2398–2407. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0595

Fukushima, Y., Oshika, Y., Nakamura, M., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Kijima, H., Ueyama, Y., Tamaoki, N., 1998. Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells. Int. J. Mol. Med. 2, 349–400. https://doi.org/10.3892/ijmm.2.3.349

Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.-M.B.-S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., Apte, R.N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Cerundolo, V., Clayton, A., Colombo, M.P., Coussens, L., Dhodapkar, M.V., Eggermont, A.M., Fearon, D.T., Fridman, W.H., Fučíková, J., Gabrilovich, D.I., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giaccone, G., Gilboa, E., Gnjatic, S., Hoos, A., Hosmalin, A., Jäger, D., Kalinski, P., Kärre, K., Kepp, O., Kiessling, R., Kirkwood, J.M., Klein, E., Knuth, A., Lewis, C.E., Liblau, R., Lotze, M.T., Lugli, E., Mach, J.-P., Mattei, F., Mavilio, D., Melero, I., Melief, C.J., Mittendorf, E.A., Moretta, L., Odunsi, A., Okada, H., Palucka, A.K., Peter, M.E., Pienta, K.J., Porgador, A., Prendergast, G.C., Rabinovich, G.A., Restifo, N.P., Rizvi, N., Sautès-Fridman, C., Schreiber, H., Seliger, B., Shiku, H., Silva-Santos, B., Smyth, M.J., Speiser, D.E., Spisek, R., Srivastava, P.K., Talmadge, J.E., Tartour, E., Van Der Burg, S.H., Van Den Eynde, B.J., Vile, R., Wagner, H., Weber, J.S., Whiteside, T.L., Wolchok, J.D., Zitvogel, L., Zou, W., Kroemer, G., 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. Oncotarget 5, 12472–12508.

Garrison, K.E., Jones, R.B., Meiklejohn, D.A., Anwar, N., Ndhlovu, L.C., Chapman, J.M., Erickson, A.L., Agrawal, A., Spotts, G., Hecht, F.M., Rakoff-Nahoum, S., Lenz, J., Ostrowski, M.A., Nixon, D.F., 2007. T Cell Responses to Human Endogenous Retroviruses in HIV-1 Infection. PLOS Pathog. 3, e165. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030165

Gimenez, J., Montgiraud, C., Pichon, J.-P., Bonnaud, B., Arsac, M., Ruel, K., Bouton, O., Mallet, F., 2010. Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. Nucleic Acids Res. 38, 2229–2246. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1214

Giovannucci, E., 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 10, 725–731.

Giovannucci, E., Michaud, D., 2007. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. Gastroenterology 132, 2208–2225. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.050

Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., Flis, S., 2013. DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. Anticancer Res. 33, 2989–2996.

Goto, T., Mizukami, H., Shirahata, A., Sakata, M., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., Hibi, K., 2009. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. Anticancer Res. 29, 275–277.

Götzinger, N., Sauter, M., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 1996. Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. J. Gen. Virol. 77, 2983–2990. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-12-2983

Grabski, D.F., Hu, Y., Sharma, M., Rasmussen, S.K., 2019. Close to the Bedside: A Systematic Review of Endogenous Retroviruses and Their Impact in Oncology. J. Surg. Res. 240, 145–155. https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.02.009

Griffiths, D.J., 2001. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. Genome Biol. 2, reviews1017.1-reviews1017.5.

Groom, J.R., Luster, A.D., 2011. CXCR3 in T cell function. Exp. Cell Res. 317, 620–631. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017

Hagen, J.W., Pugliano-Mauro, M.A., 2018. Nonmelanoma Skin Cancer Risk in Patients With Inflammatory Bowel Disease Undergoing Thiopurine Therapy: A Systematic Review of the Literature. Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al 44, 469–480. https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001455

Herbst, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., 1996. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. Am. J. Pathol. 149, 1727–1735.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J.M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J., 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. 363, 711–723. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466

Hogarth, L.A., Redfern, C.P.F., Teodoridis, J.M., Hall, A.G., Anderson, H., Case, M.C., Coulthard, S.A., 2008. The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. Biochem. Pharmacol. 76, 1024–1035. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.026

Hollenbach, P.W., Nguyen, A.N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., Krushel, L., Aukerman, S.L., Heise, C., MacBeth, K.J., 2010. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. PloS One 5, e9001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009001

Huh, J.-W., Kim, D.-S., Kang, D.W., Ha, H.-S., Ahn, K., Noh, Y.-N., Min, D.S., Chang, K.-T., Kim, H.-S., 2008. Transcriptional regulation of GSDML gene by antisense-oriented HERV-H LTR element. Arch. Virol. 153, 1201–1205. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0105-y

Hurst, T.P., Magiorkinis, G., 2017. Epigenetic Control of Human Endogenous Retrovirus Expression: Focus on Regulation of Long-Terminal Repeats (LTRs). Viruses 9. https://doi.org/10.3390/v9060130

Iacopetta, B., 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. Hum. Mutat. 21, 271–276. https://doi.org/10.1002/humu.10175

Imperiale, T.F., Ransohoff, D.F., Itzkowitz, S.H., Levin, T.R., Lavin, P., Lidgard, G.P., Ahlquist, D.A., Berger, B.M., 2014. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening [WWW Document]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1311194. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311194

Jacob, B.J., Moineddin, R., Sutradhar, R., Baxter, N.N., Urbach, D.R., 2012. Effect of colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: an instrumental variable analysis. Gastrointest. Endosc. 76, 355-364.e1. https://doi.org/10.1016/j.gie.2012.03.247

Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D.E., Fauci, A.S., Koenig, S., 1990. Circulating CD8 + cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature 348, 245. https://doi.org/10.1038/348245a0

Jang, H.S., Shin, W.J., Lee, J.E., Do, J.T., 2017. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. Genes 8. https://doi.org/10.3390/genes8060148

Jass, J.R., 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology 50, 113–130. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x

Javier, R.T., Butel, J.S., 2008. The History of Tumor Virology. Cancer Res. 68, 7693–7706. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3301

Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalcberg, J.R., Tu, D., Au, H.-J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J., Tebbutt, N.C., van Hazel, G., Wierzbicki, R., Langer, C., Moore, M.J., 2007. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. N. Engl. J. Med. 357, 2040–2048. https://doi.org/10.1056/NEJMoa071834

Jung, B., Doctolero, R.T., Tajima, A., Nguyen, A.K., Keku, T., Sandler, R.S., Carethers, J.M., 2004. Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. Gastroenterology 126, 64–659. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.008

Kassiotis, G., 2014. Endogenous Retroviruses and the Development of Cancer. J. Immunol. 192, 1343–1349. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302972

Katoh, I., Kurata, S., 2013. Association of Endogenous Retroviruses and Long Terminal Repeats with Human Disorders. Front. Oncol. 3. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00234

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology 121, 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x

Kisseljova, N.P., Kisseljov, F.L., 2005. DNA demethylation and carcinogenesis. Biochem. Biokhimiia 70, 743–752.

Klein, C.B., Costa, M., 1997. DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. Mutat. Res. Mutat. Res. 386, 163–180. https://doi.org/10.1016/S1383-5742(96)00052-X

Krishnadas, D.K., Bai, F., Lucas, K.G., 2013. Cancer testis antigen and immunotherapy. ImmunoTargets Ther. 2, 11–19. https://doi.org/10.2147/ITT.S35570

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol. Aspects Med., Real-time Polymerase Chain Reaction 27, 95–125. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007

Kuehn, F., Mullins, C.S., Krohn, M., Harnack, C., Ramer, R., Krämer, O.H., Klar, E., Huehns, M., Linnebacher, M., 2016. Establishment and characterization of HROC69 - a Crohn´s related colonic carcinoma cell line and its matched patient-derived xenograft. Sci. Rep. 6, 24671. https://doi.org/10.1038/srep24671

Kyi, C., Postow, M.A., 2014. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. FEBS Lett. 588, 368–376. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.015

Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Köchert, K., Bouhlel, M.A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Jöhrens, K., Wurster, K.D., Callen, D.F., Harte, M.F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P.N., Siebert, R., Dörken, B., Bonifer, C., Mathas, S., 2010. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the *CSF1R* proto-oncogene in human lymphoma. Nat. Med. 16, 571–579. https://doi.org/10.1038/nm.2129

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., Szustakowki, J., International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921. https://doi.org/10.1038/35057062

Lao, V.V., Grady, W.M., 2011. Epigenetics and Colorectal Cancer. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 8, 686–700. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173

Laska, M.J., Nissen, K.K., Nexø, B.A., 2013. (Some) Cellular Mechanisms Influencing the Transcription of Human Endogenous Retrovirus, HERV-Fc1. PLoS ONE 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053895

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R.C., Zaheer, A., Fisher, G.A., Crocenzi, T.S., Lee, J.J., Duffy, S.M., Goldberg, R.M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhaijee, F., Huebner, T., Hruban, R.H., Wood, L.D., Cuka, N., Pardoll, D.M., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Zhou, S., Cornish, T.C., Taube, J.M., Anders, R.A., Eshleman, J.R., Vogelstein, B., Diaz, L.A., 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N. Engl. J. Med. 372, 2509–2520. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596

Lee, J.-M., Choi, J.-Y., Kim, J.-S., Hyun, B.-H., Kim, H.-S., 2000. Identification and Phylogeny of New Human Endogenous Retroviral Sequences Belonging to the HERV-H Family. AIDS Res. Hum. Retroviruses 16, 2055–2058. https://doi.org/10.1089/088922200750054792

Lee, Y.N., Bieniasz, P.D., 2007. Reconstitution of an Infectious Human Endogenous Retrovirus. PLOS Pathog. 3, e10. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030010

Leoz, M.L., Carballal, S., Moreira, L., Ocaña, T., Balaguer, F., 2015. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. Appl. Clin. Genet. 8, 95–107. https://doi.org/10.2147/TACG.S51484

Li, H., Chiappinelli, K.B., Guzzetta, A.A., Easwaran, H., Yen, R.-W.C., Vatapalli, R., Topper, M.J., Luo, J., Connolly, R.M., Azad, N.S., Stearns, V., Pardoll, D.M., Davidson, N., Jones, P.A., Slamon, D.J., Baylin, S.B., Zahnow, C.A., Ahuja, N., 2014. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. Oncotarget 5, 587–598. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1782

Li, M., Radvanyi, L.G., Yin, B., Li, J., Chivukula, R., Lin, K., Lu, Y., Shen, J., Chang, D.Z., Li, D., Johanning, G.L., Wang-Johanning, F., 2017. Down-regulation of human endogenous retrovirus type K (HERV-K) viral env RNA in pancreatic cancer cells decreases cell proliferation and tumor growth. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0001

Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., Chng, W.-J., 2015. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. World J. Gastroenterol. WJG 21, 84–93. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84

Lim, D.H.K., Maher, E.R., 2011. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. Obstet. Gynaecol. 12, 37–42. https://doi.org/10.1576/toag.12.1.037.27556

Liu, M., Ohtani, H., Zhou, W., Ørskov, A.D., Charlet, J., Zhang, Y.W., Shen, H., Baylin, S.B., Liang, G., Grønbæk, K., Jones, P.A., 2016. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 10238–10244. https://doi.org/10.1073/pnas.1612262113

Liu, M., Thomas, S.L., DeWitt, A.K., Zhou, W., Madaj, Z.B., Ohtani, H., Baylin, S.B., Liang, G., Jones, P.A., 2018. Dual Inhibition of DNA and Histone Methyltransferases Increases Viral Mimicry in Ovarian Cancer Cells. Cancer Res. 78, 5754–5766. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3953

López-Nevot, M.A., Esteban, F., Ferrón, A., Gutiérrez, J., Oliva, M.R., Romero, C., Huelin, C., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., 1989. HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. Br. J. Cancer 59, 221–226.

Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F., Boland, C.R., 2009. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. Clin. Genet. 76, 1–18. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x

Maletzki, C., Gock, M., Randow, M., Klar, E., Huehns, M., Prall, F., Linnebacher, M., 2015. Establishment and characterization of cell lines from chromosomal instable colorectal cancer. World J. Gastroenterol. WJG 21, 164–176. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.164

Mallet, F., Bouton, O., Prudhomme, S., Cheynet, V., Oriol, G., Bonnaud, B., Lucotte, G., Duret, L., Mandrand, B., 2004. The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 1731–1736. https://doi.org/10.1073/pnas.0305763101

Mangeney, M., de Parseval, N., Thomas, G., Heidmann, T., 2001. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. J. Gen. Virol. 82, 2515–2518. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2515

Manoochehri, M., Borhani, N., Karbasi, A., Koochaki, A., Kazemi, B., 2016. Promoter hypermethylation and downregulation of the FAS gene may be involved in colorectal carcinogenesis. Oncol. Lett. 12, 285–290. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4578

Marcus, L., Lemery, S.J., Keegan, P., Pazdur, R., 2019. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. Clin. Cancer Res. clincanres.4070.2018. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4070

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268, 1336–1338.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M.J., 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int. J. Mol. Sci. 18. https://doi.org/10.3390/ijms18010197

Marquet, R., Isel, C., Ehresmann, C., Ehresmann, B., 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. Biochimie 77, 113–124. https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88114-4

Martin, M.A., Bryan, T., Rasheed, S., Khan, A.S., 1981. Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 4892–4896.

Matsuoka, M., Jeang, K.-T., 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. Nat. Rev. Cancer 7, 270. https://doi.org/10.1038/nrc2111

Matutes, E., 2007. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. J. Clin. Pathol. 60, 1373–1377. https://doi.org/10.1136/jcp.2007.052456

Morozov, V.A., Dao Thi, V.L., Denner, J., 2013. The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. PloS One 8, e70399. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070399

Mostofsky, E., Mukamal, K.J., Giovannucci, E.L., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., 2016. Key Findings on Alcohol Consumption and a Variety of Health Outcomes From the Nurses' Health Study. Am. J. Public Health 106, 1586–1591. https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303336

Mullins, C.S., Hühns, M., Krohn, M., Peters, S., Cheynet, V., Oriol, G., Guillotte, M., Ducrot, S., Mallet, F., Linnebacher, M., 2016. Generation, Characterization and Application of Antibodies Directed against HERV-H Gag Protein in Colorectal Samples. PLoS ONE 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153349

Mullins, C.S., Linnebacher, M., 2012a. Human endogenous retroviruses and cancer: causality and therapeutic possibilities. World J. Gastroenterol. 18, 6027–6035. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6027

Mullins, C.S., Linnebacher, M., 2012b. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. Cancer Immunol. Immunother. 61, 1093–1100. https://doi.org/10.1007/s00262-011-1183-3

Munshi, P.N., Lubin, M., Bertino, J.R., 2014. 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy. The Oncologist 19, 760–765. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0178

Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., Födinger, D., Seppele, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., Löwer, R., Jansen, B., Pehamberger, H., Wolff, K., 2003. An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells. Cancer Res. 63, 8735–8741.

Nelson, P.N., Carnegie, P.R., Martin, J., Davari Ejtehadi, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J., Murray, P.G., 2003. Demystified . . . Human endogenous retroviruses. Mol. Pathol. 56, 11–18.

Ning, Y., Wang, L., Giovannucci, E.L., 2010. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. Obes. Rev. 11, 19–30. https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00613.x

Ogawa, S., Nagao, M., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Ko, S., Ikeda, N., Nakajima, Y., 2004. The breakdown of apoptotic mechanism in the development and progression of colorectal carcinoma. Anticancer Res. 24, 1569–1579.

Øines, M., Helsingen, L.M., Bretthauer, M., Emilsson, L., 2017. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 31, 419–424. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.06.004

Okamoto, K., Fujisawa, J., Reth, M., Yonehara, S., 2006. Human T-cell leukemia virus type-I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF-kappaB. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. 11, 177–191. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00927.x

Ørskov, A.D., Treppendahl, M.B., Skovbo, A., Holm, M.S., Friis, L.S., Hokland, M., Grønbæk, K., 2015. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. Oncotarget 6, 9612–9626.

Ostwald, C., Linnebacher, M., Weirich, V., Prall, F., 2009. Chromosomally and microsatellite stable colorectal carcinomas without the CpG island methylator phenotype in a molecular classification. Int. J. Oncol. 35, 321–327.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Galon, J., 2009. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer [WWW Document]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa051424. https://doi.org/10.1056/NEJMoa051424

Passardi, A., Canale, M., Valgiusti, M., Ulivi, P., 2017. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. Int. J. Mol. Sci. 18. https://doi.org/10.3390/ijms18061324

Pasternak, B., Svanström, H., Schmiegelow, K., Jess, T., Hviid, A., 2013. Use of azathioprine and the risk of cancer in inflammatory bowel disease. Am. J. Epidemiol. 177, 1296–1305. https://doi.org/10.1093/aje/kws375

Pat Bucy, R., 1988. The effects of immunosuppressive pharmacological agents on the induction of cytotoxic and suppressor T lymphocytes in vitro. Immunopharmacology 15, 65–72. https://doi.org/10.1016/0162-3109(88)90053-7

Peng, D., Kryczek, I., Nagarsheth, N., Zhao, L., Wei, S., Wang, W., Sun, Y., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Kotarski, J., Tarkowski, R., Dou, Y., Cho, K., Hensley-Alford, S., Munkarah, A., Liu, R., Zou, W., 2015. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. Nature 527, 249–253. https://doi.org/10.1038/nature15520

Penn, I., 1974. Chemical immunosuppression and human cancer. Cancer 34, 1474–1480. https://doi.org/10.1002/1097-0142(197410)34:8+<1474::AID-CNCR2820340820>3.0.CO;2-V

Pérot, P., Mullins, C.S., Naville, M., Bressan, C., Hühns, M., Gock, M., Kühn, F., Volff, J.-N., Trillet-Lenoir, V., Linnebacher, M., Mallet, F., 2015. Expression of young HERV-H loci in the course of colorectal carcinoma and correlation with molecular subtypes. Oncotarget 6, 40095–40111.

Polakis, P., 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer 1332, F127–F147. https://doi.org/10.1016/S0304-419X(97)00008-5

Prak, E.T.L., Kazazian, H.H.Jr., 2000. Mobile elements and the human genome. Nat. Rev. Genet. 1, 134. https://doi.org/10.1038/35038572

Pretlow, T.P., Pretlow, T.G., 2005. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Initiation of colorectal cancer? Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer, The KRAS Oncogene 1756, 83–96. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.06.002

Raj, K., Mufti, G.J., 2006. Azacytidine (Vidaza®) in the treatment of myelodysplastic syndromes. Ther. Clin. Risk Manag. 2, 377–388.

Rayner, E., van Gool, I.C., Palles, C., Kearsey, S.E., Bosse, T., Tomlinson, I., Church, D.N., 2016. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. Nat. Rev. Cancer 16, 71–81. https://doi.org/10.1038/nrc.2015.12

Ribet, D., Harper, F., Esnault, C., Pierron, G., Heidmann, T., 2008. The GLN Family of Murine Endogenous Retroviruses Contains an Element Competent for Infectious Viral Particle Formation. J. Virol. 82, 4413–4419. https://doi.org/10.1128/JVI.02141-07

Romanish, M.T., Cohen, C.J., Mager, D.L., 2010. Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer. Semin. Cancer Biol. 20, 246–253. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.005

Römer, C., Singh, M., Hurst, L.D., Izsvák, Z., 2017. How to tame an endogenous retrovirus: HERVH and the evolution of human pluripotency. Curr. Opin. Virol., Animal models for viral diseases • Paleovirology 25, 49–58. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.001

Rosenberg, N., 2010. Overview of Retrovirology, in: Retroviruses and Insights into Cancer. Springer, New York, NY, pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09581-3_1

Roulois, D., Yau, H.L., Singhania, R., Wang, Y., Danesh, A., Shen, S.Y., Han, H., Liang, G., Pugh, T.J., Jones, P.A., O'Brien, C., De Carvalho, D.D., 2015. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. Cell 162, 961–973. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.056

Ruprecht, K., Mayer, J., Sauter, M., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2008. Endogenous retroviruses. Cell. Mol. Life Sci. 65, 3366–3382. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8496-1

Rycaj, K., Plummer, J.B., Yin, B., Li, M., Garza, J., Radvanyi, L., Ramondetta, L.M., Lin, K., Johanning, G.L., Tang, D.G., Wang-Johanning, F., 2015. Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 471–483. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0388

Safaeian, M., Robbins, H., Berndt, S., Lynch, C., Fraumeni, J., Engels, E., 2016. Risk of colorectal cancer after solid organ transplantation in the United States. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. 16, 960–967. https://doi.org/10.1111/ajt.13549

Saito, Y., Nakaoka, T., Sakai, K., Muramatsu, T., Toshimitsu, K., Kimura, M., Kanai, T., Sato, T., Saito, H., 2016. Inhibition of DNA Methylation Suppresses Intestinal Tumor Organoids by Inducing an Anti-Viral Response. Sci. Rep. 6, 25311. https://doi.org/10.1038/srep25311

Santoni, F.A., Guerra, J., Luban, J., 2012. HERV-H RNA is abundant in human embryonic stem cells and a precise marker for pluripotency. Retrovirology 9, 111. https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-111

Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T., Coulie, P.G., 2002. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. Cancer Res. 62, 5510–5516.

Schmiegel, W., Buchberger, B., Follmann, M., Graeven, U., Heinemann, V., Langer, T., Nothacker, M., Porschen, R., Rödel, C., Rösch, T., Schmitt, W., Wesselmann, S., Pox, C., 2017. S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom. Z. Für Gastroenterol. 55, 1344–1498. https://doi.org/10.1055/s-0043-121106

Schneider-Stock, R., Diab-Assef, M., Rohrbeck, A., Foltzer-Jourdainne, C., Boltze, C., Hartig, R., Schönfeld, P., Roessner, A., Gali-Muhtasib, H., 2005. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. J. Pharmacol. Exp. Ther. 312, 525–536. https://doi.org/10.1124/jpet.104.074195

Serafino, A., Balestrieri, E., Pierimarchi, P., Matteucci, C., Moroni, G., Oricchio, E., Rasi, G., Mastino, A., Spadafora, C., Garaci, E., Vallebona, P.S., 2009. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. Exp. Cell Res. 315, 849–862. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.12.023

Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., 2001. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2′-deoxycytidine treatment. Int. J. Cancer 94, 243–251. https://doi.org/10.1002/ijc.1452

Sharrard, R.M., Royds, J.A., Rogers, S., Shorthouse, A.J., 1992. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. Br. J. Cancer 65, 667–672.

Shin, A., Hong, C.W., Sohn, D.K., Chang Kim, B., Han, K.S., Chang, H.J., Kim, J., Oh, J.H., 2011. Associations of Cigarette Smoking and Alcohol Consumption With Advanced or Multiple Colorectal Adenoma Risks: A Colonoscopy-based Case-Control Study in Korea. Am. J. Epidemiol. 174, 552–562. https://doi.org/10.1093/aje/kwr098

Smith, A.J., Smith, L.A., 2016. Viral Carcinogenesis. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 144, 121–168. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.007

Söreide, K., Janssen, E. a. M., Söiland, H., Körner, H., Baak, J.P.A., 2006. Microsatellite instability in colorectal cancer. Br. J. Surg. 93, 395–406. https://doi.org/10.1002/bjs.5328

Souza, R.F., Appel, R., Yin, J., Wang, S., Smolinski, K.N., Abraham, J.M., Zou, T.T., Shi, Y.Q., Lei, J., Cottrell, J., Cymes, K., Biden, K., Simms, L., Leggett, B., Lynch, P.M., Frazier, M., Powell, S.M., Harpaz, N., Sugimura, H., Young, J., Meltzer, S.J., 1996. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. Nat. Genet. 14, 255–257. https://doi.org/10.1038/ng1196-255

Stoye, J.P., 2001. Endogenous retroviruses: Still active after all these years? Curr. Biol. 11, R914–R916. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00553-X

Suzuki, M.M., Bird, A., 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat. Rev. Genet. 9, 465–476. https://doi.org/10.1038/nrg2341

Tajadini, M., Panjehpour, M., Javanmard, S.H., 2014. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. Adv. Biomed. Res. 3. https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998

Tarafa, G., Villanueva, A., Farré, L., Rodríguez, J., Musulén, E., Reyes, G., Seminago, R., Olmedo, E., Paules, A.B., Peinado, M.A., Bachs, O., Capellá, G., 2000. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. Oncogene 19, 546–555. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203353

Tartaglione, A.M., Cipriani, C., Chiarotti, F., Perrone, B., Balestrieri, E., Matteucci, C., Sinibaldi-Vallebona, P., Calamandrei, G., Ricceri, L., 2019. Early Behavioral Alterations and Increased Expression of Endogenous Retroviruses Are Inherited Across Generations in Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid. Mol. Neurobiol. 56, 3736–3750. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1328-x

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P., 1982. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7837–7841.

Taylor, G.P., 2015. Editorial Commentary: Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-1–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. Clin. Infect. Dis. 61, 57–58. https://doi.org/10.1093/cid/civ231

Thune, I., Lund, E., 1996. Physical activity and risk of colorectal cancer in men and women. Br. J. Cancer 73, 1134–1140.

Tomlins, S.A., Laxman, B., Dhanasekaran, S.M., Helgeson, B.E., Cao, X., Morris, D.S., Menon, A., Jing, X., Cao, Q., Han, B., Yu, J., Wang, L., Montie, J.E., Rubin, M.A., Pienta, K.J., Roulston, D., Shah, R.B., Varambally, S., Mehra, R., Chinnaiyan, A.M., 2007. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. Nature 448, 595–599. https://doi.org/10.1038/nature06024

Tönjes, R.R., Löwer, R., Boller, K., Denner, J., Hasenmaier, B., Kirsch, H., König, H., Korbmacher, C., Limbach, C., Lugert, R., Phelps, R.C., Scherer, J., Thelen, K., Löwer, J., Kurth, R., 1996. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc. 13 Suppl 1, S261-267.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. CA. Cancer J. Clin. 65, 87–108. https://doi.org/10.3322/caac.21262

Trojan, J., Brieger, A., Raedle, J., Weber, N., Kriener, S., Kronenberger, B., Caspary, W.F., Zeuzem, S., 2004. BAX and caspase-5 frameshift mutations and spontaneous apoptosis in colorectal cancer with microsatellite instability. Int. J. Colorectal Dis. 19, 538–544. https://doi.org/10.1007/s00384-004-0597-1

Tu, X., Li, S., Zhao, L., Xiao, R., Wang, X., Zhu, F., 2017. Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses. Virol. Sin. 32, 280–289. https://doi.org/10.1007/s12250-017-3984-9

Tugnet, N., Rylance, P., Roden, D., Trela, M., Nelson, P., 2013. Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? Open Rheumatol. J. 7, 13–21. https://doi.org/10.2174/1874312901307010013

Turner, R.M., Pirmohamed, M., 2015. Pharmacogenetics of Adverse Drug Reactions, in: Grech, G., Grossman, I. (Eds.), Preventive and Predictive Genetics: Towards Personalised Medicine, Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–156. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15344-5_6

Vogt, P.K., 2012. Retroviral Oncogenes: A Historical Primer. Nat. Rev. Cancer 12, 639–648. https://doi.org/10.1038/nrc3320

Wagner, S., Mullins, C.S., Linnebacher, M., 2018. Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. World J. Gastroenterol. 24, 5418–5432. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i48.5418

Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Azerou, R., Lu, D.W., Chen, D.-T., Johanning, G.L., 2003. Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. Cancer 98, 187–197. https://doi.org/10.1002/cncr.11451

Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Johanning, G.L., Khazaeli, M.B., LoBuglio, A.F., Shaw, D.R., Strong, T.V., 2001. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 7, 1553–1560.

Wang-Johanning, F., Li, M., Esteva, F.J., Hess, K.R., Yin, B., Rycaj, K., Plummer, J.B., Garza, J.G., Ambs, S., Johanning, G.L., 2014. Human Endogenous Retrovirus Type K Antibodies and mRNA as Serum Biomarkers of Early-Stage Breast Cancer. Int. J. Cancer J. Int. Cancer 134, 587–595. https://doi.org/10.1002/ijc.28389

Wang-Johanning, F., Radvanyi, L., Rycaj, K., Plummer, J.B., Yan, P., Sastry, K.J., Piyathilake, C.J., Hunt, K.K., Johanning, G.L., 2008. Human Endogenous Retrovirus K Triggers an Antigen-Specific Immune Response in Breast Cancer Patients. Cancer Res. 68, 5869–5877. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6838

Wentzensen, N., Coy, J.F., Knaebel, H.-P., Linnebacher, M., Wilz, B., Gebert, J., von Knebel Doeberitz, M., 2007. Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. Int. J. Cancer 121, 1417–1423. https://doi.org/10.1002/ijc.22826

Westdorp, H., Fennemann, F.L., Weren, R.D.A., Bisseling, T.M., Ligtenberg, M.J.L., Figdor, C.G., Schreibelt, G., Hoogerbrugge, N., Wimmers, F., de Vries, I.J.M., 2016. Opportunities for immunotherapy in microsatellite instable colorectal cancer. Cancer Immunol. Immunother. 65, 1249–1259. https://doi.org/10.1007/s00262-016-1832-7

Wierzbicki, P.M., Adrych, K., Kartanowicz, D., Stanislawowski, M., Kowalczyk, A., Godlewski, J., Skwierz-Bogdanska, I., Celinski, K., Gach, T., Kulig, J., Korybalski, B., Kmiec, Z., 2013. Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation. World J. Gastroenterol. WJG 19, 4363–4373. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i27.4363

Wolin, K.Y., Yan, Y., Colditz, G.A., Lee, I.-M., 2009. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. Br. J. Cancer 100, 611–616. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604917

World Health Organisation, 2018. Cancer - Key Facts [WWW Document]. URL https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed 3.6.19).

Worthley, D.L., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Leggett, B.A., 2007. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. World J. Gastroenterol. WJG 13, 3784–3791. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i28.3784

Xu, Y., Pasche, B., 2007. TGF-β signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. Hum. Mol. Genet. 16, R14–R20. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl486

Yang, H., Bueso-Ramos, C., DiNardo, C., Estecio, M.R., Davanlou, M., Geng, Q.-R., Fang, Z., Nguyen, M., Pierce, S., Wei, Y., Parmar, S., Cortes, J., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., 2014. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. Leukemia 28, 1280–1288. https://doi.org/10.1038/leu.2013.355

Yi, J.-M., Kim, H.-M., Kim, H.-S., 2006. Human endogenous retrovirus HERV-H family in human tissues and cancer cells: expression, identification, and phylogeny. Cancer Lett. 231, 228–239. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.02.001

Yuan, B., Zhang, J., Wang, H., Xiong, L., Cai, Q., Wang, T., Jacobsen, S., Pradhan, S., Wang, Y., 2011. 6-Thioguanine reactivates epigenetically silenced genes in acute lymphoblastic leukemia cells by facilitating proteasome-mediated degradation of DNMT1. Cancer Res. 71, 1904–1911. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3430

Zare, M., Mostafaei, S., Ahmadi, A., Azimzadeh Jamalkandi, S., Abedini, A., Esfahani-Monfared, Z., Dorostkar, R., Saadati, M., 2018. Human endogenous retrovirus env genes: Potential blood biomarkers in lung cancer. Microb. Pathog. 115, 189–193. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.040

Zhao, H., Ning, S., Nolley, R., Scicinski, J., Oronsky, B., Knox, S.J., Peehl, D.M., 2017. The immunomodulatory anticancer agent, RRx-001, induces an interferon response through epigenetic induction of viral mimicry. Clin. Epigenetics 9, 4. https://doi.org/10.1186/s13148-017-0312-z

Zhao, J., Rycaj, K., Geng, S., Li, M., Plummer, J.B., Yin, B., Liu, H., Xu, X., Zhang, Y., Yan, Y., Glynn, S.A., Dorsey, T.H., Ambs, S., Johanning, G.L., Gu, L., Wang-Johanning, F., 2011. Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. Genes Cancer 2, 914–922. https://doi.org/10.1177/1947601911431841

Zhou, F., Krishnamurthy, J., Wei, Y., Li, M., Hunt, K., Johanning, G.L., Cooper, L.J., Wang-Johanning, F., 2015. Chimeric antigen receptor T cells targeting HERV-K inhibit breast cancer and its metastasis through downregulation of Ras. Oncoimmunology 4, e1047582. https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1047582

Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., Näthke, I.S., 2001. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. Curr. Biol. CB 11, 44–49.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden.

_____ _____

Datum, Ort Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Herrn PD Dr. rer. nat Michael Linnebacher für die Bereitstellung des Themas, der umfassenden Betreuung und der Möglichkeit diese Arbeit in der AG MOI durchführen zu dürfen.

Die Anfertigung dieser Arbeit wäre so ohne Frau Dr. rer. nat. Christina Mullins nicht möglich gewesen, die mich schrittweise in die Thematik & Methodik einarbeitete, meine ständige Ansprechpartnerin im Laboralltag war und die ersten Versionen dieser Arbeit kontrollierte.

Herr Matthias Krohn unterstütze mich während der gesamten Zeit in vielerlei Hinsicht und hatte als „gute Seele des Labors“ immer ein offenes Ohr. Einen besonderen Dank möchte ich für die Bereitstellung der Proben, der Zellkulturunterstützung und der Betreuung bei allen technischen Fragen aussprechen.

Zusätzlich zu erwähnen ist Fatemeh Shokraie, deren bereitgestellten Vorergebnisse die erste Zelllinienauswahl für meine Arbeit deutlich erleichterten.

Ebenfalls sehr wertgeschätzt habe ich die Hilfe durch Stephanie Bock und Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki, die mich bei akuten Fragen stets unterstützten.

Zu guter Letzt ist noch die Deutsche Krebshilfe zu nennen, deren großzügige finanzielle Unterstützung mit Hilfe des Mildred-Scheel-Doktorandenprogramms mir die konzentrierte Laborarbeit im Rahmen eines Urlaubssemesters ermöglichte.

gefördert durch

Deutsche Krebshilfe
HELFEN. FORSCHEN. INFORMIEREN.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.